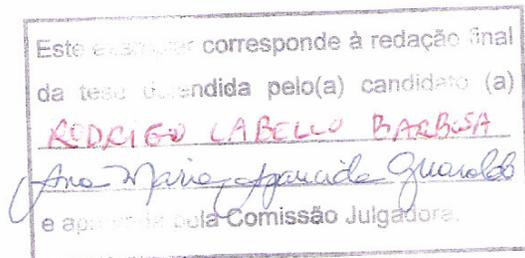


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



RODRIGO LABELLO BARBOSA

**TRANSMISSÃO ORAL DO *Trypanosoma cruzi*
PELA POLPA DE AÇAÍ EM CAMUNDONGOS**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO

Campinas/SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

B275r

Barbosa-Labello, Rodrigo

Transmissão oral do *Trypanosoma cruzi* pela polpa de
açai em camundongos / Rodrigo Labello Barbosa. –
Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Ana Maria Aparecida Guaraldo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Chagas, Doença de. 3.
Transmissão por via oral. 4. Açai – Polpa. 5.
Camundongo - Imunodeficiência. I. Guaraldo, Ana Maria
Aparecida, 1951-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* by açai pulp in mice.

Palavras-chave em inglês: *Trypanosoma cruzi*; Chagas' disease; Oral transmission pathway; Açai – Pulp; Mice - Immunodeficiency.

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Mestre em Parasitologia.

Banca examinadora: Ana Maria Aparecida Guaraldo, Luiz Augusto Corrêa Passos, Nanci do Nascimento.

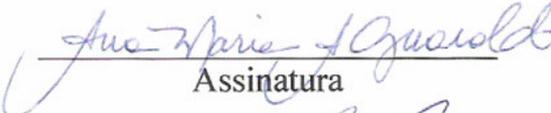
Data da defesa: 11/06/2010.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

LOCAL E DATA DA DEFESA: Campinas, 11 de Junho de 2010.

BANCA EXAMINADORA:

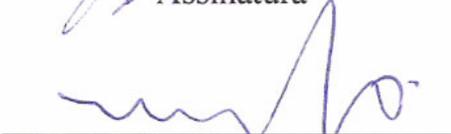
Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo
(Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos


Assinatura

Profa. Dra. Nanci do Nascimento


Assinatura

Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida

Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Às pessoas de todo o Brasil envolvidas nos casos de doença de Chagas aguda pelo consumo da polpa de açaí contaminada com *Trypanosoma cruzi*
com a consciência do meu papel na sociedade,
eis a minha contribuição científica e a minha sincera solidariedade
a todos aqueles que tiveram suas vidas modificadas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Ministério da Saúde (MS), instituições responsáveis pelo financiamento desse projeto.

Ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia e ao Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (IB/UNICAMP), por toda colaboração durante as atividades envolvidas nesse trabalho.

Ao Centro Multidisciplinar para a Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP), pelo treinamento e infra-estrutura indispensáveis ao desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos, meu orientador de coração, não somente pela grande amizade, ensino e disponibilidade, mas principalmente por me proporcionar uma experiência diferenciada, por acreditar em mim, reconhecer o meu esforço e pela confiança depositada para a realização desse trabalho.

À orientadora Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo, pelas considerações sempre tão enriquecedoras e de fundamental importância a esse estudo, pela sabedoria, generosidade, amizade, atenção, paciência e especialmente por me mostrar e fazer abraçar tantas outras oportunidades.

A todos os funcionários e colegas de trabalho do CEMIB, mas especialmente à Viviane Liotti Dias, Andréia Ruis Salgado, Ana Paula Gimenes, Sônia Cano Montebelo Rachel, Jéssica Maria Inácio Madoenho, Danielle Maria Silva Yahn, Mirian Michelle Machado e ao Prof. Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat, não apenas pela ajuda, incentivo e profissionalismo, como também pela convivência diária e por tornarem o ambiente de trabalho um lugar mais divertido e mais agradável.

Às colegas de Mestrado, Laura Jane Gisloti e Carina Mara de Souza, pela amizade, alegria, parceria nos estudos e pelos momentos compartilhados.

À Profa. Dra. Nanci do Nascimento (IPEN/USP), ao Prof. Dr. Flávio Luis Schmidt (FEA/UNICAMP), à Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco, à Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti e ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares (IB/UNICAMP), pelas valiosas sugestões e críticas durante as diversas etapas, até a finalização dessa pesquisa.

À Profa. Dra. Karen Signori Pereira (EQ/UFRJ), pela parceria de trabalho, amizade e que por toda sua determinação, merece igualmente o meu sincero reconhecimento.

A minha família: a minha mãe Rita de Cássia Labello, a minha irmã Aline de Cássia Labello Monti, ao Luiz Ângelo Monti (*in memoriam*) e em especial aos meus avós Neuza Dalbo Labello e Vicente Labello, pelo apoio incondicional e compreensão durante esse período.

Aos meus amigos e a todas as pessoas que passaram pelo meu caminho durante esse tempo e que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação e se sentem parte dela.

Aos animais de laboratório. A todos eles, o meu profundo respeito.

A Deus, pela minha vida e por colocar em meu caminho pessoas tão especiais.

Ao tempo, por me fazer acreditar que o amanhã será ainda melhor.

“Não vai demorar que passemos adiante uma grande e bela ciência, que faz arte em defesa da vida.”

Carlos Chagas

“Viver é como andar de bicicleta. É preciso estar em constante movimento para manter o equilíbrio.”

Albert Einstein

“Nós somos do tamanho dos nossos sonhos.”

Fernando Pessoa

RESUMO

TRANSMISSÃO ORAL DO *Trypanosoma cruzi* PELA POLPA DE AÇAÍ EM CAMUNDONGOS.

Em virtude de seu alto grau de impacto socioeconômico, a doença de Chagas está entre as mais importantes doenças parasitárias das Américas Central e do Sul. Entre as vias de transmissão, a forma oral tem contribuído para o surgimento de novos casos e se dá principalmente pela ingestão de formas tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* presentes em diferentes alimentos. A polpa de açaí possui excelentes propriedades nutricionais e é muito consumida em todo o Brasil e no exterior. Entretanto, ela vem sendo associada nos últimos anos a microepidemias da doença de Chagas aguda, especialmente na região Norte do país, onde esse fruto é o principal suplemento da dieta alimentar da população e movimenta uma parcela significativa da economia local. O objetivo desse trabalho foi a avaliação da sobrevivência *in vitro* e da virulência do *T. cruzi* em polpa de açaí mantida por diferentes períodos de incubação e submetida a diferentes tratamentos térmicos, por meio de infecções experimentais. Alíquotas de polpa *in natura* de açaí proveniente de Belém (PA) foram misturadas a 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas do plasma de camundongos CBA/JUnib. As amostras, devidamente homogeneizadas, foram mantidas à temperatura ambiente, refrigeração ou congelamento por períodos de incubação de até 144 horas e descongeladas quando necessário. Em seguida, para a análise da sobrevivência, a metodologia *in vitro* adotada foi o isolamento do parasito por filtração em lã de *nylon*. O produto obtido foi analisado por microscopia óptica comum e utilizado para a análise *in vivo* da virulência do parasito. Camundongos isogênicos imunodeficientes C.B-17-Prkdc^{scid}/PasUnib, fêmeas e machos adultos, infectados com esse produto pelas vias intraperitoneal, gavagem e oral, foram previamente submetidos à antibioticoterapia com cefalexina e posteriormente observados durante 40 dias. A parasitemia foi realizada pelo método de Brener e a mortalidade registrada diariamente. Os resultados relevantes demonstraram que a sobrevivência e a virulência do parasito foram preservadas após 144 horas da mistura mantida sob refrigeração (4°C), após 26

horas de congelamento (-20°C) e também após tratamento térmico combinado, sendo a mistura mantida inicialmente por 48 horas à temperatura ambiente e em seguida, por 72 horas a 4°C. O estudo demonstrou ainda, que todas as vias de inoculação utilizadas foram eficientes, havendo retardo significativo no início da parasitemia por infecção oral. A mortalidade dos animais ocorreu até o 25º dia após a infecção. Concluiu-se que o *T. cruzi* foi capaz de sobreviver na polpa de açaí por diferentes períodos de incubação e sob diversos tratamentos térmicos, além de preservar a sua virulência em camundongos. Esse fato é de importância epidemiológica e descarta os processos de refrigeração e congelamento convencionais, durante os períodos de tempo testados, como métodos de controle da transmissão oral da doença de Chagas aguda.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas aguda, transmissão oral, polpa de açaí, camundongo imunodeficiente.

ABSTRACT

ORAL TRANSMISSION OF *Trypanosoma cruzi* BY AÇAÍ PULP IN MICE.

Due to the high social and economic impact, Chagas' disease is among the most important parasitic infection in the South and Central Americas. Concerning the routes of transmission, the oral way has been contributing to the arising of new cases and it occurs as a consequence of the ingestion of metacyclic trypomastigotes present in different foods. The açai pulp has an elevated nutritional trace and is very popular in Brazil and abroad. However, in recent years, it has been associated with outbreaks of acute Chagas' disease, especially in the northern region of the Brazil, where this fruit is the main diet supplement for the population and drives a significant portion of the local economy. Thus, the aims of this study were to evaluate the *in vitro* survival, the virulence of *Trypanosoma cruzi* in the açai pulp and the potential of this mixture for oral infection. For that, the mixture was maintained for different periods on different temperatures of incubation. These thermic treatments were followed by experimental infections in immunodeficient mice. Aliquots of fresh açai pulp from Belém (PA) were mixed with 10^5 trypomastigotes of *T. cruzi* Y strain obtained from blood plasma of CBA/JUnib. The samples, properly homogenized, were kept at room temperature, refrigerated or frozen by periods of incubation up to 144 hours and thawed for analysis. The methodology used for survival analysis was by isolation of parasites *in vitro* using isolation of parasites by nylon wool membrane for filtration. The yield collected was examined on optical microscope and used for virulence analysis *in vivo*. C.B-17-Prkdc^{scid}/PasUnib immunodeficient inbred mice, adult males and females, were previously submitted to antibiotic therapy with cephalexin and followed infection by inserting the filtrated into the animals through different routes: intraperitoneal, *gavage* or oral and during at least 40 days the animals had been observed. Thereafter, the parasitemy was performed by Brener's method and their mortality was daily recorded. The relevant results demonstrated the survival and the virulence of the parasite were preserved even after 144 hours in the mixture, when it was kept under refrigeration (4°C), after 26 hours of freezing (-20°C) and also after combined thermic treatment, which was the mixture

initially maintained initially for 48 hours at room temperature and then after maintained for 72 hours at 4°C. The study also demonstrated that all routes used for the mice inoculations were effective, but a significant delay was observed at the onset of parasitemy by oral infection was observed. The death of the animals occurred until the 25th day after infection. It was concluded that *T. cruzi* was able to survive in açai pulp for different periods of incubation and thermic treatment, moreover the açai pulp did not interfere in the parasite capacity to cause Chagas' disease. This fact is very important at the epidemiological point of view and discards the processes of conventional cooling and freezing, during these time periods tested, as methods for control of the oral transmission of acute Chagas' disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, acute Chagas' disease, oral transmission pathway, açai pulp, immunodeficient mice.

SUMÁRIO

1. Introdução -----	1
2. Revisão da Literatura -----	3
2.1. A doença de Chagas -----	4
2.2. A transmissão oral da doença de Chagas aguda experimental	6
2.3. A transmissão oral da doença de Chagas aguda em humanos	8
2.4. O açaí -----	14
2.5. O modelo animal -----	18
3. Objetivos -----	22
3.1. Objetivo geral -----	23
3.2. Objetivos específicos -----	23
4. Material e Método -----	24
4.1. O parasito -----	25
4.2. Os animais -----	25
4.3. A polpa de açaí -----	25
4.4. Procedimentos experimentais -----	26
4.4.1. Isolamento das formas de <i>T. cruzi</i> presentes na polpa de açaí -----	26
4.4.1.1. Pré-teste -----	26
4.4.1.2. Teste de isolamento do parasito por centrifugação ----	26
4.4.1.3. Teste de isolamento do parasito por tamisação forçada -----	27
4.4.2. Avaliação da interferência da polpa de açaí na sobrevivência do <i>T. cruzi</i> : testes <i>in vitro</i> -----	29
4.4.3. Avaliação da influência da polpa de açaí na virulência do <i>T. cruzi</i> : testes <i>in vivo</i> -----	30
4.4.4. Certificação do modelo animal imunodeficiente -----	30
4.4.5. Manutenção dos animais -----	30
4.4.6. Tratamento da polpa de açaí -----	31
4.4.7. Tratamento dos animais para os ensaios com a polpa de	

açai <i>in natura</i> -----	31
4.4.7.1. Administração do antibiótico pela via i.p. -----	32
4.4.7.2. Administração do antibiótico pela via gavagem -----	32
4.4.7.3. Administração do antibiótico na água do bebedouro -	32
4.4.8. Avaliação da viabilidade e do poder de infecção do <i>T. cruzi</i>	32
4.4.8.1. Verificação da parasitemia e da mortalidade -----	33
4.4.9. As amostras -----	33
4.4.9.1. Controle negativo -----	34
4.4.9.2. Controle positivo -----	35
4.4.9.3. Grupos teste: eluato -----	35
4.4.9.4. Grupos teste: mistura -----	36
4.4.10. Os grupos experimentais -----	36
4. 5. Análise estatística -----	39
5. Resultados -----	41
5.1. Pré-teste -----	42
5.2. Testes de isolamento das formas de <i>T. cruzi</i> presentes na polpa de açai -----	42
5.2.1. Método da centrifugação -----	42
5.2.2. Método da tamisação forçada -----	42
5.3. Avaliação da interferência da polpa de açai na sobrevivência do <i>T. cruzi</i> : testes <i>in vitro</i> -----	43
5.3.1. Sobrevivência do <i>T. cruzi</i> em polpa de açai autoclavada e mantida à temperatura ambiente -----	43
5.3.2. Sobrevivência do <i>T. cruzi</i> em polpa <i>in natura</i> de açai e mantida a 4°C -----	44
5.3.3. Sobrevivência do <i>T. cruzi</i> em polpa <i>in natura</i> de açai e mantida a -20°C -----	44
5.4. Avaliação da interferência da polpa de açai na virulência do <i>T.</i> <i>cruzi</i> : Testes <i>in vivo</i> -----	45
5.4.1. Mistura produzida com a polpa de açai autoclavada e mantida à temperatura ambiente -----	45

5.4.2. Tratamento combinado: mistura produzida com a polpa <i>in natura</i> de açaí e mantida à temperatura ambiente e a 4°C -----	47
5.4.3. Mistura produzida com a polpa <i>in natura</i> de açaí e mantida a 4°C -----	48
5.4.4. Mistura produzida com a polpa autoclavada e polpa <i>in natura</i> de açaí mantidas a -20°C -----	52
5.4.5. Grupos experimentais: misturas produzidas com a polpa <i>in natura</i> de açaí contaminada e mantidas por 24 horas sob diferentes tratamentos térmicos -----	59
5.4.5.1. Evolução da parasitemia dos grupos experimentais --	65
6. Discussão -----	73
7. Conclusões -----	91
8. Referências Bibliográficas -----	93
9. Anexo -----	111
9.1. Evolução da parasitemia -----	112
9.2. Dados estatísticos -----	116
9.3. Certificação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA/UNICAMP) -----	119

1. INTRODUÇÃO

Em decorrência de seu alto grau de impacto socioeconômico, a doença de Chagas está entre as mais importantes doenças parasitárias do continente americano. Entre as suas vias de transmissão, a forma oral tem contribuído para o surgimento de novos casos e se dá principalmente pela ingestão de formas tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* presentes em diferentes alimentos.

A ocorrência de doença de Chagas aguda (DCA) relacionada ao consumo de alimentos constituía, até o ano de 2004, um evento pouco conhecido ou investigado, embora notificados pelo Ministério da Saúde. Recentemente, microepidemias de DCA com casos graves e importante letalidade na região Norte do Brasil, têm sido associadas à transmissão do *T. cruzi* pela polpa de açaí, seja pela contaminação dos frutos ou da própria polpa por meio de dejetos de animais reservatórios ou de insetos vetores infectados das áreas endêmicas.

Dadas as suas propriedades nutricionais, a polpa de açaí é um alimento muito consumido no Brasil e em diversos outros países. Na região amazônica, especialmente no estado do Pará, esse fruto é o principal suplemento da dieta alimentar da população e em virtude de sua alta produtividade, a comercialização de açaí representa uma importante fonte de renda, o que o torna imprescindível à economia local.

Apesar de surtos de DCA indicarem a possibilidade da transmissão oral, o levantamento bibliográfico concernente a alimentos e à relação parasito-hospedeiro, demonstrou que essa relação é pouco estudada. Até o momento eram ainda controversos os dados referentes à sobrevivência e à infectividade de formas tripomastigotas em polpa de açaí contaminada.

Por se tratar de uma questão relevante à saúde pública e à pesquisa aplicada em doença de Chagas, tendo em vista que o açaí foi o alimento associado ao maior número de casos ocorridos na região Norte nos últimos anos, estudos envolvendo modelos animais apropriados serão determinantes para melhor entender a relação *T. cruzi* - açaí. Por esta razão, no CEMIB/UNICAMP, que apresenta infra-estrutura adequada e experiência prévia em trabalhos experimentais com *T. cruzi*, foi estabelecido um convênio com o Ministério da Saúde, nº 667/2008, para a realização de ensaios *in vitro* e *in vivo*, mediante a infecção experimental da polpa de açaí contaminada em camundongos imunodeficientes, por diferentes períodos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A doença de Chagas

A tripanossomose americana foi descoberta em 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1878-1934), no município de Lassance, interior do Estado de Minas Gerais (CHAGAS, 1909). Após 100 anos de sua descoberta e caracterização, a doença ainda não apresenta cura e muitos aspectos científicos ainda carecem de esclarecimentos.

Historicamente, a transmissão ao homem acontece sobretudo em áreas rurais da América Latina e nas proximidades da zona urbana, quando nelas há modificação ou destruição do ambiente natural (DIAS, 1999; DIAS, 2000).

A doença se estabelece por meio de um ciclo biológico complexo e ocorre pela transmissão do *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado, da Ordem Kinetoplastida e da Família Trypanosomatidae. O ciclo inclui dois tipos de hospedeiros. O primeiro é um inseto hemíptero e hematófago, popularmente conhecido como barbeiro, e o segundo, um mamífero reservatório que pode pertencer a diversas classes, como marsupiais e roedores (DEANE et al., 1984).

Nos triatomíneos, o *T. cruzi* multiplica-se no tubo digestório, alcançando a sua forma infectante, denominada tripomastigota metacíclica, na porção terminal do intestino, sendo eliminada nas excreções dos insetos. Nos mamíferos, o parasito circula no sangue, alojando-se principalmente nos tecidos musculares, como o coração, onde ocorre a sua multiplicação (COURA, 2003).

A doença apresenta duas fases distintas: a inicial ou aguda, muitas vezes assintomática ou oligossintomática, caracterizada pela presença do tripomastigota no sangue do hospedeiro; e a segunda fase, quando há evolução para a forma crônica, que é caracterizada pelo comprometimento dos tecidos cardíaco e/ ou digestório do doente, com difícil detecção de parasitos circulantes (COURA, 2003; BRITTO, 2009).

Pode ainda existir a fase indeterminada ou de latência, na qual não há sintomatologia clínica importante. Alguns pacientes chagásicos permanecem nessa fase sem nunca atingir a fase crônica da doença (COURA, 2003; BRITTO, 2009).

Em indivíduos cuja doença evolui para a fase crônica, pode haver o aparecimento de insuficiência cardíaca, megaesôfago e megacólon (LOPES &

CHAPADEIRO, 2004). Os custos do tratamento de um doente chagásico crônico para o sistema público de saúde são enormes, em decorrência da morbidade, da hospitalização e do tratamento dos sintomas. Há sobrecarga da previdência social com um montante de aposentadorias precoces e os pacientes podem-se tornar marginalizados na sociedade em função de sua aparente impossibilidade de trabalhar (MONCAYO & SILVEIRA, 2009).

A doença de Chagas está entre as mais importantes infecções parasitárias e no final do século passado foi considerada como a mais importante pelo Banco Mundial, por apresentar um impacto socioeconômico significativamente maior que o obtido pelo efeito combinado de todas as outras infecções causadas por parasitos (WHO, 2002).

Está amplamente distribuída nas Américas Central e do Sul, estendendo-se do sul dos Estados Unidos até a Argentina (SZAJNMAN et al., 2005). Embora a prevalência da infecção no continente americano tenha reduzido cerca de 70% por volta do ano 2000 (MONCAYO, 2003), em 2009, a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009) estimou que cerca de 12 milhões de pessoas estivessem infectadas com doença de Chagas nas Américas - sendo dois milhões somente no Brasil - e que mais de dez mil pessoas morreriam por ano em consequência da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Na América do Sul, principalmente no Brasil, Equador, Chile, Paraguai, Uruguai e na Bolívia, Argentina e Venezuela, a doença de Chagas constitui grave e alarmante problema de saúde pública e, por afetar principalmente pessoas de países em desenvolvimento, é ainda uma doença negligenciada, com pouco investimento em diagnóstico, tratamento e prevenção (WHO, 2009).

Em função de ações de controle de vetores a partir da década de 1980, o Brasil recebeu, em 2006, a Certificação Internacional pela Interrupção da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, espécie importada e responsável pela maior parte da transmissão vetorial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Apesar do sucesso de programas para a redução da transmissão vetorial e do registro de menos ocorrências pelas vias congênita e transfusional, assim como por meio de secreções das relações sexuais, por acidentes laboratoriais ou por transplantes de órgãos não inspecionados (DIAS et al., 2000), o Brasil não estará livre da doença

nas próximas décadas, seja pelo grande número de chagásicos crônicos idosos, seja porque nos últimos anos vêm ocorrendo mudanças em seu perfil epidemiológico, com destaque para a via oral, por meio do consumo de alimentos contaminados (MONCAYO & SILVEIRA, 2009).

Segundo a Secretaria de Estado da Saúde do Amazonas (SUSAM), em 2009, o município de Barcelos, localizado no Norte do Amazonas, registrou casos da infecção durante trabalhos de coleta de piaçaba, uma espécie de palmeira cujas fibras são utilizadas na confecção de vassouras e escovas (AGÊNCIA BRASIL, 2010). De acordo com o Relatório Técnico elaborado na cidade de Manaus (2005) pela Secretaria Técnica da Organização Pan-Americana de Saúde é de fundamental importância a orientação da população sobre como evitar a contaminação acidental pelo *T. cruzi* durante a coleta dessa matéria-prima, que apesar de se constituir em importante atividade comercial e particular daquela região, pode ampliar sobremaneira as possibilidades de transmissão da doença.

De acordo com Rodriguez-Morales et al. (2009), atualmente, muitos estudos estão voltados para a ocorrência da doença de Chagas em países europeus como Espanha, Suíça, França, Itália, Alemanha e Inglaterra, pois a transmissão oral da doença de Chagas implica na transmissão do *T. cruzi* para áreas antes consideradas não endêmicas, em virtude da exportação de alimentos contaminados.

2.2. A transmissão oral da doença de Chagas aguda experimental

A transmissão oral da doença de Chagas se estabelece por meio da ingestão de formas tripomastigotas metacíclicas, dada a capacidade de sobrevivência do parasito na presença do suco gástrico (CAMANDARROBA et al., 2002).

Embora tenha sido amplamente divulgada pela mídia a partir de 2005, estudos revelaram que a via oral na transmissão do *T. cruzi* não é um fato recente. Sua importância é conhecida há muito tempo e a infecção em animais onívoros e insetívoros susceptíveis ocorrem com a predação ou com a ingestão de um alimento contaminado (PEREIRA et al., 2009).

Logo após a descoberta da tripanossomose, Carlos Chagas e Oswaldo Cruz descreveram o primeiro caso de transmissão oral da doença quando saguis (*Callitrix penicillata*), colocados em jaula juntamente com insetos infectados pelo protozoário, adquiriram o parasito durante a predação. Na ocasião, a hipótese considerada para a contaminação foi a ingestão dos insetos pelos saguis (DIAS, 2006).

No entanto, Coura em 1997 relatou os achados de Nattan-Larrier em 1921: a demonstração experimental de transmissão da infecção chagásica pela via oral ao reproduzir a doença de Chagas em animais de laboratório por meio da administração oral de formas tripomastigotas (COURA, 1997).

Da mesma maneira, Dias (1940) relatou que o pesquisador Ezequiel Dias fez a primeira referência oficial a esse modo de transmissão em 1933, ao observar, em seu laboratório, tatus se alimentarem do triatomíneo *Panstrongylus megistus*. Posteriormente, a confirmação da transmissão se deu pela observação de gatos que se alimentaram de barbeiros e roedores infectados.

Yaeger (1971), na Louisiana, nos Estados Unidos, demonstrou que gambás adquiriram infecção experimental por *T. cruzi* por meio da ingestão de dois triatomíneos (*Rhodnius prolixus*). De acordo com o autor, a infecção por *T. cruzi* pode ser frequente em mamíferos e roedores devido a seus hábitos alimentares insetívoros ou da predação de outros mamíferos infectados. Ainda nos Estados Unidos, Roellig et al. (2009) demonstraram, pela primeira vez, a transmissão oral de *T. cruzi* experimental em guaxinim (*Procyon lotor*), um reservatório natural naquele país, por meio da ingestão de tripomastigotas e hemípteros infectados.

Na América Latina, investigações realizadas na Venezuela por Diaz-Ungría (1968), comprovaram a contaminação oral de cães e roedores por meio de cepas locais de *T. cruzi* originadas de triatomíneos naturalmente infectados.

Ainda na década de 1980, Jansen e Deane (1985) ressaltaram a importância do gambá (*Didelphis marsupialis*) como reservatório e transmissor do *T. cruzi*. Essas autoras constataram a infecção de camundongos que ingeriram alimentos contaminados com excrementos do marsupial.

Calvo-Méndez et al. (1994) demonstraram a infecção chagásica por via oral em camundongos pela administração de água potável, leite pasteurizado, carne moída crua

ou cozida, queijo fresco e arroz cozido contaminados com fezes de *Triatoma pallidipennis*. Os autores observaram existir variação na eficiência da infecção de acordo com o tipo de alimento ingerido e demonstraram que o leite se apresentou como o meio mais efetivo para a transmissão do protozoário.

Mais recentemente, Castanho et al. (2002) relataram a infecção chagásica em camundongos por meio da ingestão de caldo de cana contaminado com fezes de *Rhodnius neglectus* contendo *T. cruzi*.

2.3. A transmissão oral da doença de Chagas aguda em humanos

No Brasil, a transmissão oral da DCA em humanos está especialmente associada à contaminação de leite materno via congênita, de leite cru ou de sucos de frutas e verduras por vetores silvestres e reservatórios vertebrados de *T. cruzi* (CAMANDAROBA et al., 2002). Muitas vezes, os insetos vetores são triturados no momento da preparação do alimento ou então há contaminação por dejetos dos reservatórios ou dos próprios vetores (RIBEIRO et al., 1987). Entretanto, a contaminação oral também pode ocorrer pelo manuseio ou consumo de carcaça crua, mal cozida ou apenas defumada de mamíferos silvestres obtidos em atividades de caça (FORATTINI et al., 1980), pela ingestão de sangue de tatus e gambás usados como remédio na medicina tradicional da Amazônia colombiana ou até mesmo por hábitos primitivos de ingestão de triatomíneos (DIAS, 2006).

O primeiro caso humano de transmissão da doença de Chagas pelo leite materno foi relatado na Argentina por Mazza et al. (1936). Após esse fato, diversos outros autores evidenciaram a presença de *T. cruzi* em leite de animais infectados experimentalmente com o parasito (FERREIRA et al., 2001).

Do ponto de vista epidemiológico, surtos da doença aguda por via alimentar vêm sendo observados desde o século passado. Porém, o destaque à importância da via oral para a transmissão da DCA aconteceu somente na década de 1960, quando Shaw et al. (1969) anteviram a possibilidade da transmissão oral da doença de Chagas na cidade de Belém (PA). Os autores observaram que quatro pessoas de uma mesma

família estavam envolvidas e que três delas encontravam-se na fase aguda da doença no momento do diagnóstico.

Desde então, muitos são os registros de microepidemias (PANAFTOSA, 2006) da DCA por transmissão alimentar em diversos estados brasileiros. A Figura 1 retirada de *Transmission of Chagas' disease (American Trypanosomiasis) by Foods* (PEREIRA et al., 2010) apresenta o mapa do Brasil, com as regiões envolvidas em episódios da DCA pela transmissão oral.

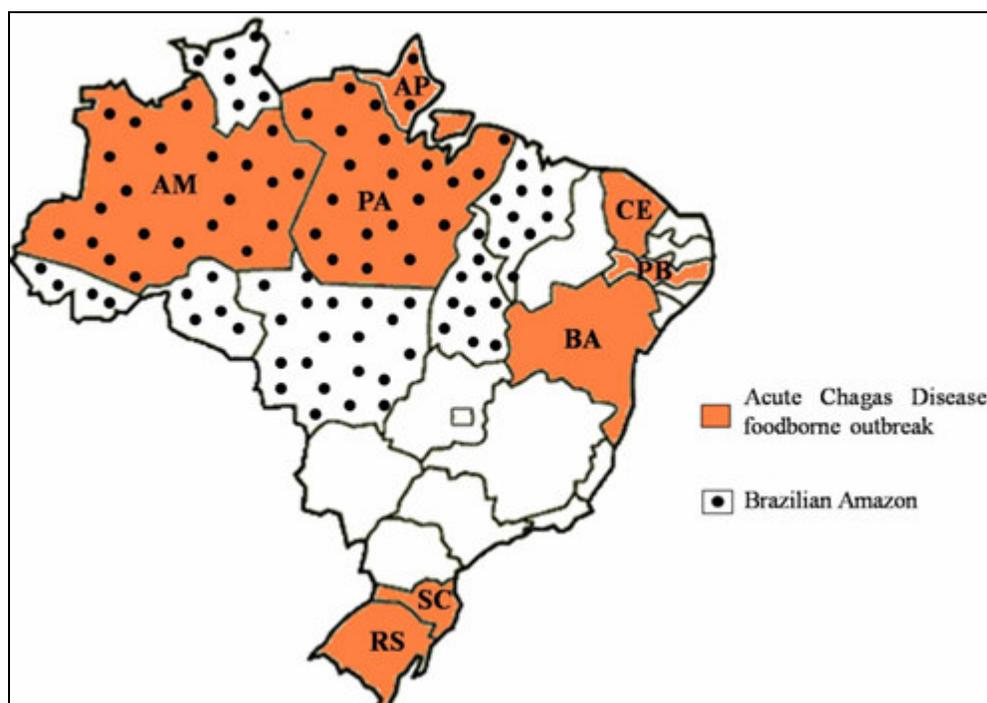


Figura 1. Estados brasileiros com relatos de surtos da doença de Chagas aguda por meio de transmissão alimentar, retirada de *Transmission of Chagas' disease (American Trypanosomiasis) by Foods* (PEREIRA et al., 2010).

Ainda na década de 1960, foi descrito de fato o primeiro surto de infecção humana pelo *T. cruzi* devido à transmissão oral do parasito em alimentos. Silva et al. (1968) relataram o caso no distrito de Teutônia, município de Estrela (RS), no ano de 1965, envolvendo 17 pessoas, das quais seis vieram a falecer. Nesse episódio, as pessoas adoeceram praticamente no mesmo dia e apresentaram quadro clínico de miocardite aguda. Todos os suspeitos (funcionários, alunos e professores) possuíam em comum

apenas o fato de frequentarem a Escola Agrícola e lá realizarem suas refeições. Um estudo sorológico e entomológico sugeriu a contaminação da horta por excretas e secreções provenientes das glândulas anais de marsupiais, uma vez que foram encontrados nas proximidades exemplares infectados pelo *T. cruzi*.

Outro importante surto de etiologia alimentar foi identificado 20 anos mais tarde, em Catolé do Rocha (PB), em 1986. Nele, 26 pessoas adoeceram entre sete e 22 dias após participar de uma festividade na fazenda Aroeira. Uma delas faleceu de insuficiência cardíaca congestiva (SHIKANAY-YASUDA, 1987). A refeição era composta de churrasco de boi e carneiro, buchada de carneiro, carne de porco cozida, salada e caldo de cana moído no local. Os estudos epidemiológicos preliminares apontaram para uma provável contaminação da comida e/ou dos utensílios por excretas contaminadas do mamífero *Didelphis albiventris* (denominado popularmente como gambá-de-orelha-branca, saruê ou mucura), frequente nas proximidades do domicílio (MARCONDES et al., 1987). Posteriormente, evidências relacionadas à sobrevivência de *T. cruzi* em caldo de cana, associadas ao fato de a máquina de moer cana abrigar barbeiros, sugeriram a possibilidade de esse alimento ter atuado como veículo de transmissão da infecção chagásica na Paraíba (LEWINSOHN, 2005a,2005b).

Em Mazagão (AP), em outubro de 1996, um surto de DCA afetou 17 pessoas de três famílias diferentes. O possível mecanismo de transmissão foi a ingestão de suco de açaí contaminado com fezes de triatomíneos. O suco foi preparado à noite e os insetos atraídos pela luz elétrica caíram dentro da máquina de moer e foram triturados juntamente com o fruto (VALENTE et al., 1999).

Pinto et al. (2003) informaram a ocorrência de um surto de DCA provavelmente transmitida via oral, envolvendo 12 pessoas de duas famílias, com dois óbitos, em Igarapé-Miri (PA), em julho de 2002.

Em março de 2005, com destaque dado pela mídia internacional, foi registrado um surto de DCA no estado de Santa Catarina, decorrente do consumo de caldo de cana especificamente em um quiosque da BR-101, na cidade de Navegantes, importante área turística no sul do Brasil (PANAFTOSA, 2006). Na ocasião, a Secretaria de Saúde do Estado divulgou uma nota oficial em que foram constatadas infecções de 24 pessoas e que três delas evoluíram para óbito (SVS, 2007c).

Duas hipóteses foram sugeridas para a contaminação do caldo de cana com os protozoários. A primeira delas foi a moagem de triatomíneos com cana; e a segunda, a contaminação da garapa com excretas de animais silvestres, tendo em vista que foram encontrados dez triatomíneos em uma palmeira próxima ao local; 30 na mata fechada atrás do quiosque; um vetor infectado no quiosque; e ainda, uma fêmea de gambá com quatro filhotes, todos infectados (IANNI & MADY, 2005).

Na sequência, em 31 de março do mesmo ano, um relatório do Instituto Evandro Chagas (PA) esclareceu um surto de doença aguda na comunidade do Igarapé da Fortaleza, área portuária da cidade de Santana (AP), ocorrido em dezembro de 2004. Nesse surto, 27 pacientes, de seis famílias diferentes, foram confirmados com DCA e o relato comum era o consumo de açaí, possivelmente contaminado com fezes de barbeiro no local de venda (SVS, 2005).

A ocorrência desses episódios em um curto intervalo de tempo e em locais tão distintos foi determinante para que a transmissão oral da doença de Chagas ganhasse espaço na imprensa escrita e falada e, também, no meio científico.

A partir de então, a divulgação de matérias referindo-se ao consumo de açaí como meio de transmissão da doença de Chagas surpreendeu a população brasileira, gerando insegurança tanto entre produtores como entre consumidores do país.

Os artigos *“The oral transmission of Chagas’ disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks”* (BARBOSA, 2006) e *“Further comments on oral transmission of Chagas’ disease in Brazil: Epidemiology, geographical distribution and viability of the infective parasite”* (BENCHIMOL-BARBOSA, 2009) retomaram as discussões sobre os dados científicos até então pouco difundidos na área de alimentos com relação à transmissão pela via oral, bem como sobre as estratégias de prevenção.

Segundo o Laboratório de Doença de Chagas do Instituto Evandro Chagas (PA) e da Secretaria de Vigilância em Saúde, foram registrados 592 casos de doença de Chagas na Amazônia brasileira entre 1968 e 2007. Deste número, 587 foram confirmados como DCA, sendo 440 (74,95%) associados a surtos familiares. Até 2006, apesar de ser um evento pouco divulgado, foram notificados cerca de 430 casos de DCA relacionados ao consumo de alimentos contaminados somente na região amazônica brasileira (SVS, 2007a).

De acordo com Nóbrega et al. (2009), em 2006, ano em que a forma oral foi identificada como um potencial risco para a saúde pública, um total de 116 casos de DCA foram notificados em todo o Brasil. Na cidade de Barcarena (PA) foram registradas 11 ocorrências possivelmente associadas ao consumo de açaí e no distrito de Mojuí dos Campos, em Santarém (PA), ocorreu um surto vinculado ao consumo de açaí branco, ou bacaba, com 17 casos, entre eles um óbito confirmado (SVS, 2007c).

Além disso, nesse mesmo ano, a Secretaria da Saúde do Estado do Ceará informou um relato da doença aguda envolvendo oito pessoas das famílias de duas irmãs, em Redenção (CE). As idades variaram de dois a 35 anos, sendo duas pessoas do sexo masculino e seis do sexo feminino. Estudos epidemiológicos apontaram a transmissão pela via oral e o veículo possível foi uma sopa preparada com água de um reservatório em condições precárias de higiene (SESA, 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

Em 2007, no município de Coari (AM) um surto vinculado ao consumo de suco de açaí em um único ponto atingiu 25 pessoas. Nesse mesmo ano, foram registrados 161 casos da doença no Brasil, principalmente nos estados do Pará, Amazonas e Amapá, de acordo com dados do Ministério da Saúde (SVS, 2007c).

Ainda em 2007, em Belém (PA), três pessoas foram diagnosticadas com DCA. Os estudos epidemiológicos concluíram que o consumo de camarão cru esteve associado à infecção, possivelmente contaminado com fezes de triatomíneos ou dejetos de marsupiais e roedores infectados, durante o armazenamento ou o transporte para a comercialização do produto (FREITAS et al., 2008).

Nesse mesmo período, foram ainda notificados dois casos de DCA, sem óbitos, provavelmente associados à transmissão alimentar, nas cidades de Breves e Bagre (PA). Em Breves, 12 pacientes diagnosticados pertenciam à mesma família e haviam compartilhado o almoço e o jantar, composto de carne seca, frango, farinha de mandioca, açaí e água. Em Bagre, os 13 pacientes participaram de uma reunião familiar e dormiram na mesma casa, sendo a refeição composta de peixe, farinha de mandioca, açaí, açúcar e água (BELTRÃO et al., 2009).

Em 2008, no Brasil, foram notificados 131 casos de DCA. Apesar de a maioria dos relatos se concentrarem na região amazônica (com 129 casos na região Norte) e estar associada à transmissão oral pelo consumo frequente da polpa de açaí

contaminada (SVS, 2010), a água também esteve vinculada a outro surto. Em Macaúbas (BA), houve o relato de transmissão a sete indivíduos da mesma família (pai, mãe e cinco filhos), sendo dois óbitos, provavelmente decorrentes da ingestão de água inadequadamente armazenada e contaminada com fezes de triatomíneos (DIAS et al., 2008).

Dados divulgados pela mídia paraense (INSTITUTO EVANDRO CHAGAS, Diário do Pará, 25/08/2009) indicaram que apesar das medidas de prevenção já adotadas, até agosto de 2009, o Instituto Evandro Chagas havia identificado 22 casos agudos no estado do Pará, nos municípios de Paragominas, Belém, Moju, Castanhal, Abaetetuba, Barcarena, com o maior número de casos ocorrido em uma comunidade rural do rio Mutuacá, em Currealinho, extremo sul da Ilha de Marajó. Segundo comunicação pessoal com a Coordenadora Estadual de Controle da Doença de Chagas da Secretaria de Estado e Saúde Pública do Pará (SESPA), Elenild de Góes Costa, até novembro de 2009, foram confirmados mais de 100 casos. Mais uma vez, associava-se à hipótese de transmissão pela via oral, por meio da ingestão de açaí contaminado pelo parasito.

Dados ainda não publicados, porém difundidos pela mídia mostraram que em janeiro de 2010, o município de Santa Isabel do Rio Negro (AM) registrou um surto de DCA em que 12 pessoas, sendo oito adultos e quatro crianças, foram infectadas após a ingestão de polpa de açaí produzida em condições sanitárias inadequadas. De acordo com a SUSAM, os pacientes não apresentaram risco de morte, mas precisarão ser acompanhados pelos próximos cinco anos (AGÊNCIA BRASIL, 2010).

Outros estudos recentes relataram casos da doença de Chagas na América Latina. O surto com o maior número de casos já relacionado à transmissão oral da doença aguda ocorreu na Escola Municipal Andrés Bello, na cidade de Chacao, região metropolitana de Caracas, na Venezuela, em dezembro de 2007. Dos 128 casos confirmados, 75% eram de jovens menores de 18 anos que apresentaram sintomatologia característica de fase aguda como febre persistente por mais de sete dias, dor abdominal, dor de cabeça, mialgia, diarreia, edema facial e taquicardia. Do total, 12 pacientes foram hospitalizados, e, entre eles, houve um óbito. Os estudos epidemiológicos concluíram que a fonte de infecção foi a contaminação de suco de goiaba produzido sem condições adequadas de higiene. Insetos vetores infectados

foram coletados próximos ao local de processamento do suco, além de uma funcionária responsável pela produção da bebida ser soropositiva para IgM e IgG (VILLALOBOS, 2007; RODRIGUEZ-MORALES, 2008; MILES, 2010; NOYA et al., 2010).

Ainda na Venezuela, no município de Chichiriviche de la Costa, no estado de Vargas, em abril de 2009, 47 estudantes e três professores adoeceram. Nesse surto, foram registrados três óbitos e a hipótese mais provável da morte na fase aguda da doença de Chagas foi a ingestão de suco de goiaba contaminado (ISID, 2009).

Na Colômbia, foram notificados dois surtos de DCA provavelmente causados por alimentos contaminados. O primeiro ocorreu em 1999 na cidade de Guamal, estado de Magdalena, onde 13 pacientes com febre e miocardite aguda foram diagnosticados, dos quais cinco faleceram. Exemplos de *Panstrongylus geniculatus* infectados foram coletados em palmeiras próximas à área e a conclusão foi de que o *viño de palma*, uma bebida típica fermentada e consumida na região, sofreu contaminação por fezes de triatomíneos (PANAFTOSA, 2006; HERNANDÉZ et al., 2009).

O segundo surto ocorreu em 2008, em Bucaramanga, envolvendo dez pacientes. O ponto em comum foi a ingestão de suco de tangerina de um mesmo local por nove pacientes sintomáticos, sendo três de uma mesma família e três trabalhadores, jovens entre 21 e 22 anos de idade, do aeroporto Palonegro de Lebrija, dos quais um morreu. (HERNANDÉZ et al., 2009).

2.4. O açaí

A região amazônica apresenta grande quantidade de plantas perenes, com particular relevância para as espécies frutíferas (NOGUEIRA et al., 1995). Dentre elas destaca-se o açaí, fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea* Martius), que é uma palmeira pertencente à divisão Magnoliophyta, antiga Angiospermae, e membro da família Arecaceae, que por sua forma e seu aspecto é a mais característica da flora tropical (OLIVEIRA et al., 2002).

O gênero *Euterpe* reúne aproximadamente 30 espécies, ocorre nas Américas Central e do Sul e está distribuído por toda bacia amazônica, sendo *E. oleracea*, *E. edulis* e *E. precatoria* as três espécies mais frequentes (SIQUEIRA et al., 1998).

Segundo definição encontrada no Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa (HOUAISS et al., 2001), a etimologia da palavra “açai” é “*ĩwasa'ĩ*” ou “*ĩçá-çai*” que em tupi significa “fruto que chora, isto é, que deita água”, fazendo referência à lenda indígena e ao fato de a fruta expelir água. Além disso, o termo “açai” é utilizado não somente para denominar o fruto do açazeiro ou a própria palmeira, mas também a bebida que é obtida a partir de seu fruto (OLIVEIRA et al., 2002).

Açaizais nativos são comumente encontrados ao longo dos rios, em terrenos de várzea, baixadas, igarapés, áreas muito úmidas e também em terra firme. Em território brasileiro, é encontrado no Acre, Amapá, Maranhão, Pará e principalmente no estuário do rio Amazonas, estendendo-se ainda à Colômbia, ao Equador, às Guianas e à Venezuela (ROGEZ, 2000).

Aproveitado integralmente pelos habitantes da região amazônica brasileira, com destaque à produção do palmito oriundo do caule, o açazeiro, a partir da década de 1970, foi introduzido nos estados do Sul e Sudeste do país, principalmente por instituições públicas, para pesquisa e ensino, e lá se propagou (BOVI, 2004).

Atualmente, a atividade extrativista em açazeiros tem diminuído dado o interesse em seu manejo nas áreas de várzeas para a produção de frutos (HOMMA et al., 2006) por meio de programas de melhoramento genético, com a produção de híbridos obtidos por cruzamentos controlados e/ou naturais entre espécies (BOVI, 2004).

O açazeiro pode atingir altura de até 25m, possui caule de 15 a 25cm de diâmetro e ocorre geralmente formando touceiras com vários estipes (TATENO, 2001; OLIVEIRA et al., 2002).

Por ser uma espécie que se adapta facilmente a sistemas agroflorestais, uma vez que possui copa aberta, talo ereto, fácil propagação e autopoda, é de uso múltiplo (OLIVEIRA, et al., 2002) e de acordo com Oliveira & Müller (1998), seu potencial econômico encontra-se nos frutos e na palmeira, seja para a alimentação, produção de celulose, fabricação de casas, confecção de chapéus, ração animal, arborização, medicina caseira e corante natural.

Os frutos encontram-se inseridos em cachos ou infrutescências, são pequenos e arredondados e medem entre 1 e 2cm de diâmetro (TATENO, 2001; OLIVEIRA et al., 2002).

A maior parte do fruto é composta do endocarpo, ou caroço, bastante volumoso e duro. A parte comestível do açaí compõe-se, porém, do epicarpo e do mesocarpo polposo e corresponde a apenas 26,54% do peso do fruto, com cerca de 1mm de espessura, de coloração violácea ou roxo-escura quando maduros, em função da presença de antocianinas (TATENO, 2001; OLIVEIRA et al., 2002).

As flores e os frutos do açaí são essenciais para o desenvolvimento agroindustrial da região amazônica e ocorrem em todos os meses do ano, porém concentram-se no segundo semestre, entre os meses de setembro e dezembro, quando há diminuição do período de chuvas e aumento da produção de açaizeiros (OLIVEIRA et al., 2002).

De acordo com Rogez (2000), em virtude de sua grande utilização e de suas excelentes propriedades nutricionais e sensoriais, o açaí constitui-se a base da culinária paraense, sendo o mais importante suplemento alimentar da dieta da população da bacia amazônica e uma ótima alternativa para a melhoria de vida do meio rural, principalmente no estado do Pará.

Sua composição é caracterizada por um elevado teor de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, fibras, proteínas, minerais (como potássio, cálcio e ferro), vitaminas E e B1 e por um baixo teor de açúcares (ROGEZ, 2000; OLIVEIRA et al., 2002).

O potencial do açaí como alimento funcional torna-se atraente por seu conjunto de substâncias fitoquímicas, incluindo os flavonóides, as antocianinas e os polifenóis, que se destacam pelas propriedades antioxidantes e moduladoras do metabolismo (LICHTENTHÄLER et al., 2005; KUSKOSKI et al., 2006; POZO-INSFRAN et al., 2006; SCHAUSS et al., 2006a,2006b; PACHECO-PALENCIA et al., 2007).

Além disso, o alto teor de pigmentos naturais dá a cor ao alimento e contribui para o seu aspecto visual, que é um quesito de fundamental importância para sua aceitação e escolha pelos consumidores (NEIDA & ELBA, 2007).

O transporte do fruto de sua colheita a seu processamento é realizado em sacos ou cestos de palha conhecidos como paneiros, destampados ou descobertos (Figura 2) e seu consumo é feito após um pré-processamento do fruto com adição de água morna para seu despulpamento e posterior filtração, originando uma bebida chamada de açaí,

de suco de açaí, ou ainda, de vinho de açaí, como é comumente conhecida na região Norte do país (ROGEZ, 2000).



Figura 2. Paneiro de açaí comercializado na cidade de Belém do Pará (arquivo pessoal).

Estudos apontaram que a polpa é um alimento muito perecível e de fácil deterioração por fungos e bactérias, porque o fruto é extremamente manipulado durante toda a cadeia produtiva do suco (SOUSA et al., 2006).

A forma de consumo do açaí na região amazônica difere da dos demais estados brasileiros. Na cidade de Belém do Pará, por exemplo, ele é comercializado diariamente, *in natura* ou congelado, em cerca de três mil pontos de venda (MONTEIRO, 2006) e consumido na forma de vinhos, cremes, mingaus, geleias, iogurtes, sorvetes, bombons, licores, em pó, sucos (açaí grosso ou especial, açaí médio ou regular e açaí fino ou popular, dependendo da quantidade de sólidos totais), combinado com doce de leite, arroz com feijão, camarão seco, charque, peixe frito ou com alimentos regionais como farinha de mandioca ou tapioca, raramente acompanhado de açúcar, durante ou bem próximo ao período das refeições (OLIVEIRA et al., 2002; DONADIO et al., 2004).

Nas demais regiões, o açaí é comumente consumido na forma de polpa congelada, sobretudo entre os esportistas, por ser considerado uma bebida energética e, na maior parte das vezes, acrescido de xarope de guaraná e/ou frutas, cereais e carboidratos de assimilação rápida para compensar sua deficiência em açúcares simples (NOGUEIRA et al., 1995; OLIVEIRA, 1998).

O Brasil é o principal produtor natural do açaizeiro e o estado do Pará, o maior produtor e consumidor de açaí. Na entressafra, o país é abastecido parcialmente com frutos oriundos dos estados do Amapá e Maranhão (HOMMA et al., 2006).

No ano de 2006, cerca de dez mil toneladas de polpa congelada de açaí e 120 mil litros de vinho foram destinados a São Paulo, Rio de Janeiro, Pernambuco, Goiás e Brasília (PORTES, 2008).

Estima-se que de 1999 a 2004 o Brasil produziu aproximadamente 740 mil toneladas de açaí (MONTEIRO, 2006). Nos anos seguintes, estudos de mercado constataram o aumento da demanda de polpa, e só em 2007, o Pará produziu cerca de dois milhões de toneladas, sendo 25% da produção destinada à exportação. No mercado interno, a comercialização correspondeu a 60% dessa produção, com a liderança do Rio de Janeiro no consumo da polpa (PORTES, 2008).

Dessa maneira, o açaí tem conquistado consumidores não apenas no Brasil; ele já foi eleito um dos principais sabores de 2007 nos Estados Unidos (DUAILIBI, 2007), além de estar presente em importantes mercados, como Japão, Alemanha, França, Itália e Oriente Médio (MONTEIRO, 2006).

2.5. O modelo animal

O avanço na genética de camundongos, com o desenvolvimento de novos modelos animais, permitiu esclarecer alguns mecanismos envolvidos na patogenicidade de várias doenças humanas.

Os camundongos de laboratório suportam muito bem o sistema de cruzamentos consanguíneos. Em ratos e camundongos, podem ser feitos acasalamentos entre irmãos durante várias gerações, obtendo, assim, populações muito homogêneas do ponto de vista genético. Essas populações são denominadas linhagens consanguíneas e, quando acasaladas entre si durante 20 gerações, são denominadas isogênicas (GODARD & GUÉNET, 1999).

As linhagens isogênicas são muito estáveis e geneticamente padronizadas, pois apresentam formas alélicas homozigóticas para todos os *loci* do genoma e o conjunto de alelos que compõe o genoma são distribuídos de forma aleatória.

Um fator importante a ser considerado é que todas as linhagens consanguíneas de camundongos de laboratório derivam de um pequeno número de genitores. Do ponto de vista genético, isso significa que as diferenças entre os genomas das várias linhagens são também reduzidas. Esse fato se constitui em uma grande vantagem, pois permite avaliar a importância de regiões do genoma por meio de acasalamentos programados. Linhagens consanguíneas podem apresentar uma grande variabilidade de respostas em relação a agentes infecciosos. Nesse caso, é observado que, enquanto algumas linhagens são susceptíveis à infecção de um agente patogênico, outras são resistentes a ele (GODARD & GUÉNET, 1999).

Considerando a variação de susceptibilidade ao *Trypanosoma cruzi* apresentada por diversas linhagens de camundongos, é possível estabelecer alguns parâmetros da fase aguda quando a evolução do parasitismo encontra um *background* genético susceptível ou resistente (PASSOS, 2003).

Passos et al. (2002) desenvolveram uma linhagem de camundongo recombinante congênica por meio do acasalamento programado das progênes obtidas de duas linhagens isogênicas com fenótipos distintos de resistência à cepa Y do *T. cruzi* (C57BL/6/JUnib - resistente e A/JUnib - susceptível). A linhagem recombinante congênica, dotada de um *background* susceptível, apresenta fenótipo de alta resistência ao parasito, graças à transferência de regiões importantes dos cromossomos 7, 11, 14, 17 e 19.

O uso de modelos animais para o estudo da infecção por *Trypanosoma cruzi* foi estabelecido por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909) e, até 1940, cobaias, cães, coelhos, macacos e também camundongos, foram utilizados para o estudo da infecção experimental. A partir de 1960, provavelmente por influência do intenso uso de camundongos como modelo básico em estudos de imunologia geral, bem como pela facilidade e pelo baixo custo de manutenção desses animais em biotério, os trabalhos com infecção experimental por *T. cruzi* acumularam-se no modelo do camundongo (CABEZA-MECKERT & LAGUENS, 1994).

Características importantes desse modelo são a heterogeneidade do curso e a intensidade da infecção e das lesões em diferentes populações (raças, cepas), que se expressam na distinção entre modelos resistentes e susceptíveis a condições similares

de infecção. Essas características, já apontadas na década de 1940 (PIZZI et al., 1948), foram exploradas quanto ao mapeamento genético da resistência durante as décadas de 1970 e 1980 (JURI et al., 1990) e até hoje são utilizadas para facilitar estudos sobre as características da resposta imune inata e adquirida. Os padrões de resistência e susceptibilidade à infecção, medidos por meio de taxas de mortalidade, tempo de sobrevivência e níveis de parasitemia, dependem da conjugação das cepas do camundongo e do parasito, o que implica que qualquer estudo tenha de ser interpretado à luz do modelo usado (ARAÚJO-JORGE, 2000).

Como a doença humana também varia desde formas assintomáticas e muito brandas até as muito severas e letais, o fato de o camundongo apresentar fenótipos heterogêneos quanto à resistência à infecção o torna um modelo adequado. As diferentes combinações de cepa de camundongo com cepa/clone de parasito tendem a se distribuir nesse espectro quando analisados diversos parâmetros, sejam eles parasitológicos, imunológicos, histopatológicos, eletrofisiológicos ou bioquímicos (ARAÚJO-JORGE, 2000).

Modelos animais portadores das mais variadas expressões fenotípicas passaram a compor o repertório de animais disponibilizados, destacando-se as linhagens portadoras de deficiências imunológicas, principalmente os *scid* (BOSMA et al., 1983).

A imunodeficiência severa combinada ou *severe combined immunodeficiency disease (scid)* foi descrita pela primeira vez em cavalos da raça Árabe por McGuire & Poppie (1973) e posteriormente foram reconhecidos diferentes tipos que afetam diversas espécies como equinos, cães, camundongos e o homem (McGUIRE & POPPIE, 1973; BOSMA et al., 1983; CUSTER et al., 1985; SOMBERG et al., 1995).

A doença está inserida em um grupo de raras deficiências congênitas, caracterizadas pela ausência de um sistema imunológico funcional (BOSMA et al., 1983) e associa-se a um aumento da susceptibilidade a infecções. Em humanos, é popularmente conhecida como “síndrome do menino da bolha”, ocorre nos primeiros meses de vida e pode levar à morte (BOWLING, 1996; REED & BAYEY, 1998).

Em camundongos, é ocasionada por uma mutação pontual recessiva do gene *Prkdc* localizado no cromossomo 16, a qual os torna deficientes em linfócitos T e B funcionais, que são as células especializadas na defesa do organismo contra infecções

por vírus, bactérias e fungos (BOWLING, 1996; REED & BAYEY, 1998), embora apresentem células granulocíticas e *natural killer* (NK) normais (BOSMA et al., 1989), o que garante a sobrevivência e proteção por *interferon* gama.

Dessa maneira, a escolha dos *scid* para esta pesquisa foi estratégica, pois dada a sua alta susceptibilidade, favorece a detecção de formas tripomastigotas do parasito e pode trazer contribuições interessantes para a avaliação da DCA.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Esclarecer eventos relacionados à transmissão oral do *Trypanosoma cruzi*, por meio da ingestão de polpa de açaí, mediante a infecção experimental de camundongos isogênicos imunodeficientes com a polpa contaminada, mantida por diferentes períodos de incubação e tratamentos térmicos.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver uma metodologia de isolamento de formas tripomastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* presente na polpa de açaí;
- Estudar a sobrevivência do *Trypanosoma cruzi* na mistura com a polpa de açaí;
- Avaliar *in vivo* a viabilidade e a virulência do *T. cruzi* após sua permanência na polpa, em diferentes períodos de incubação e sob diversos tratamentos térmicos;
- Analisar o poder de infecção do *T. cruzi* e comparar diferentes vias de administração;
- Avaliar a evolução da fase aguda da doença experimental, por meio de infecções por diferentes vias com formas tripomastigotas recuperadas da polpa de açaí, submetidas a diferentes períodos de incubação e tratamentos térmicos.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. O parasito

Para os testes de sobrevivência e infecção foi utilizada a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, proveniente do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica na Área de Ciência de Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP), cedidas pelo Prof. Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos. As formas tripomastigotas foram utilizadas na contaminação da polpa e na infecção dos camundongos.

A manutenção *in vivo* dos tripomastigotas foi realizada semanalmente, em camundongos CBA/JUnib mantidos em unidades isoladoras e periodicamente a cepa Y foi congelada em nitrogênio líquido.

A parasitemia foi determinada mediante a contagem de tripomastigotas no sangue dos camundongos, segundo metodologia preconizada por Brener (1962).

4.2. Os animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados camundongos imunodeficientes da linhagem C.B-17-Prkdc^{scid}/PasUnib (*scid*) oriundos de colônias do CEMIB/UNICAMP, machos e fêmeas, entre oito e 12 semanas de idade, com peso médio de 30 g e marcados por amputação de falange por ocasião do desmame.

Todos os procedimentos com animais obedeceram aos “Princípios de Ética na Experimentação Animal” do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal/Sociedade Brasileira da Ciência de Animais de Laboratório (COBEA/SBCAL), de acordo com protocolo experimental nº 1569-1 submetido à Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA/UNICAMP) e aprovado em 30 de Junho de 2008 (Anexo 9.3, Figura 22).

4.3. A polpa de açaí

A polpa *in natura* de açaí utilizada era proveniente do comércio local da cidade de Belém (PA) e congelada para transporte. Assim que chegou ao laboratório foi distribuída em alíquotas de 50mL, em câmara de fluxo laminar, e mantida em *freezer* a

-20°C até o momento de uso. Na data da utilização, cada alíquota foi descongelada e, quando necessário, foi submetida ao processo de autoclavagem, a 121°C durante 20 minutos, antes dos procedimentos experimentais.

4.4. Procedimentos experimentais

4.4.1. Isolamento das formas de *T. cruzi* presentes na polpa de açaí

Para a escolha da melhor metodologia para a recuperação dos parasitos da polpa, foram realizados dois procedimentos: centrifugação e tamisação forçada, precedidos de um pré-teste.

4.4.1.1. Pré-teste

Uma quantidade conhecida de parasitos (10^5 tripomastigotas), obtida de camundongos CBA/JUnib infectados, foi misturada diretamente à polpa de açaí e também ao sobrenadante da polpa, previamente centrifugada a 705,6g. A atividade dos parasitos foi observada por microscopia óptica comum, em triplicata, com e sem coloração vital pelo Azul de *Trypan*, em intervalos regulares de 15 minutos, por um período de 15 a 60 minutos, após o contato inicial da polpa íntegra ou de seu sobrenadante com os parasitos e após a homogeneização das amostras.

4.4.1.2. Teste de isolamento do parasito por centrifugação

Foram utilizadas misturas de polpa e plasma (duas partes de polpa para cada uma parte de plasma contaminado) distribuídas em tubos tipo *ependorf* de 1,5mL e centrifugadas a 313,6g e 1254,4g, em microcentrífuga Heraeus Biofuge, durante intervalos de tempo compreendidos entre três e cinco minutos.

A primeira fase do teste foi realizada apenas com a polpa não contaminada pelo tripomastigota.

Etapas da primeira fase do teste:

1. primeiramente, foi realizada uma autoclavagem da polpa de açaí;
2. em seguida, foi feita a decantação de uma alíquota da polpa, a fim de separar os elementos de diferentes densidades, sendo a fase superficial investigada por microscopia óptica comum para excluir a presença de *T. cruzi*;
3. essa fração superficial foi, então, centrifugada sob diferentes condições;

Na segunda fase do teste, foram realizadas as seguintes etapas com o parasito:

4. quantificação dos parasitos recolhidos no sobrenadante (plasma sanguíneo) pelo método de Brener (1962), após a centrifugação do sangue obtido de camundongos previamente infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, a 705,6g, durante cinco minutos;
5. produção da mistura pelo depósito de uma quantidade conhecida de parasitos (10^5 tripomastigotas) na polpa;
6. centrifugação da mistura nas condições estabelecidas previamente;
7. recuperação e análise do sobrenadante da mistura (viabilidade e contagem).

4.4.1.3. Teste de isolamento do parasito por tamisação forçada

A) Preparo da coluna de tamisação

Uma segunda metodologia utilizada para o isolamento do parasito foi a tamisação forçada ou sob pressão do êmbolo, uma técnica de filtração adaptada no CEMIB/UNICAMP:

Para a sua realização, foram confeccionadas colunas com seringas de 3mL (Figura 3) e sua montagem se processou em câmara de fluxo laminar, como será explicado a seguir:

Primeiramente, uma camada de lã de *nylon* estéril foi depositada na base da coluna. Em seguida, foram adicionadas, intercaladamente, microesferas estéreis de plástico e de metal com diâmetro igual a 3mm, até aproximadamente a altura de 1/3 da coluna. Finalmente, a extremidade superior foi coberta com uma nova camada de lã de *nylon* estéril (Figura 4), antes da aplicação de cada amostra.



Figura 3. Coluna da tamisação sob pressão (arquivo pessoal).

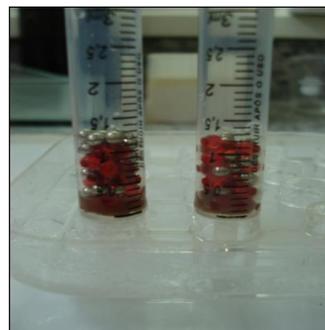


Figura 4. Detalhe da coluna com as microsferas (arquivo pessoal).

B) Aplicação das amostras

Para a realização da técnica, foram preparadas misturas homogêneas de polpa com plasma de camundongo contendo tripomastigotas, nas proporções 1:2; 1:3 e 1:4, posteriormente aplicadas individualmente às colunas (Figuras 5 e 6).

Durante a tamisação, uma pequena pressão foi exercida sobre a mistura empregando-se o êmbolo da seringa (Figura 7) e cada fração resultante, denominada eluato (o produto derivado deste processo de separação), em princípio em volumes de no máximo 50 μ L, foi examinada individualmente, de maneira qualitativa, no microscópio óptico comum.

Após a coleta de todas as frações, a coluna foi lavada com solução de NaCl 0,15M e o eluato novamente examinado.



Figura 5. Coluna de tamisação e mistura (arquivo pessoal).



Figura 6. Aplicação das amostras (arquivo pessoal).



Figura 7. Obtenção do eluato (arquivo pessoal).

C) Avaliação microscópica

Procedeu-se a pesquisa de tripomastigotas por microscopia óptica comum.

Para tanto, um volume igual a 5µL de cada uma das frações do eluato recolhido, (Figura 8), em triplicata, foi inspecionado para a detecção da presença das formas tripomastigotas do parasito.

As amostras foram recolhidas após intervalos regulares e observadas e a quantidade de parasitos foi determinada pelo método de Brener (1962).

Diferentes períodos de tempo foram testados, pois inicialmente não havia um direcionamento dos intervalos de tempo para a sobrevivência do parasito na polpa de açaí.



Figura 8. Alíquota de eluato para avaliação microscópica (arquivo pessoal).

4.4.2. Avaliação da interferência da polpa de açaí na sobrevivência do *Trypanosoma cruzi*: testes *in vitro*

Misturas formadas de polpa e parasito foram mantidas por até 144 horas, seja à temperatura ambiente, a 4°C ou a -20° C e, após sua tamisação, o eluato obtido de cada tratamento foi inspecionado.

Os resultados foram considerados segundo critérios de motilidade dos parasitos, comparando-se o padrão observado para *T. cruzi* proveniente de plasma sanguíneo, adotando-se intervalos regulares de observação por microscopia óptica comum. Os critérios adotados para classificar a atividade dos tripomastigotas foram: bem ativos (BA); ativos (A) e lentos (L).

Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevivência e ilustrados com registros de filmagem em vídeo.

4.4.3. Avaliação da influência da polpa de açaí na virulência do *Trypanosoma cruzi*: testes *in vivo*

A avaliação da capacidade da polpa para atuar na preservação da virulência de tripomastigotas recuperados da mistura exigiu testes *in vivo* utilizando-se modelos animais.

Os ensaios foram realizados empregando-se camundongos imunodeficientes da linhagem isogênica *scid*.

4.4.4. Certificação do modelo animal imunodeficiente

O animal da linhagem *scid* foi previamente certificado no CEMIB/UNICAMP quanto à sua capacidade de produzir anticorpos.

Os animais *scid leaky*, que produziram um título basal de anticorpos, foram descartados. Foram selecionados os que apresentaram nível de imunoglobulina sérica inferior a 2,5 μ L/mL, dosado pelo método Immunoblot (GORDON et al., 1991).

Em função deles, os casais foram formados, os animais mantidos em unidade isoladora de pressão positiva (PASSOS & ALVES, 1996) e a progênie utilizada neste projeto.

4.4.5. Manutenção dos animais

A integridade sanitária e genética dos camundongos *scid* foi preservada por meio de sua manutenção em condições controladas, utilizando-se unidades isoladoras flexíveis e em mini-isoladores dentro de racks ventiladas ALESCO®, instaladas dentro da área experimental (Figura 9).

Os animais receberam ração autoclavada Nuvital® e água *ad libitum*, mantidos em salas a 22°C (\pm 2), com períodos de luz de 12-14 horas/24 horas (SANTOS, 2002) e umidade relativa (UR) entre 45 e 75%, de acordo com os padrões internacionais (MERUSSE & LAPICHIK, 1996).

Após a infecção experimental, todos os animais foram mantidos com a máxima indicação de biossegurança na área experimental e manipulados apenas por técnico qualificado.

Os animais mortos e infectados foram separados em sacos plásticos vedados e incinerados (ARAÚJO-JORGE & PIRMEZ, 2000).



Figura 9. Sala de alojamento dos animais com a *rack* ventilada e a estação de troca de mini-isoladores (arquivo pessoal).

4.4.6. Tratamento da polpa de açaí

Os ensaios para avaliação da interferência da polpa na virulência do parasito foram conduzidos utilizando polpa previamente submetida à autoclavagem e também polpa *in natura*.

Fundamentalmente, os mesmos procedimentos foram utilizados nos dois grupos, exceto pela adoção de um esquema prévio de tratamento com antibiótico nos animais que receberam a polpa *in natura*.

4.4.7. Tratamento dos animais para os ensaios com a polpa de açaí *in natura*

A proteção dos camundongos foi alcançada por meio de antibioticoterapia com Cefalexina 500mg. Cada animal recebeu a dose de 1,75mg de antibiótico/dia, administrada pela via intraperitoneal (i.p.), por gavagem e pela via oral, diretamente na água do bebedouro.

4.4.7.1. Administração do antibiótico pela via intraperitoneal

A solução usada para a injeção i.p. foi obtida do sobrenadante, após a diluição das cápsulas de antibiótico em água *milli-Q*, centrifugada a 1960g, por cinco minutos, para a remoção do talco e substâncias diferentes do princípio ativo.

Os animais receberam a dose de 1,75mg/dia, dois dias antes da infecção com os *T. cruzi*.

4.4.7.2. Administração do antibiótico por gavagem

A dose de antibiótico foi administrada no dia seguinte à administração via i.p., ou seja, um dia antes da infecção com os *T. cruzi*. De igual maneira, foi utilizado o sobrenadante obtido na centrifugação após a diluição das cápsulas e os animais foram monitorados por 3 a 4 horas para avaliação do sucesso da técnica de gavagem.

4.4.7.3. Administração do antibiótico na água do bebedouro

No esquema de cobertura adotado, imediatamente após a infecção com os tripomastigotas, foi administrado o antibiótico na água do bebedouro e o tratamento foi realizado no período de sete dias consecutivos.

Conforme descrito, as cápsulas foram diluídas, centrifugadas e ajustadas para a concentração de 1,75mg-animal/dia, considerando o peso médio de cada animal (30g), a ingestão média de água de 15mL/100g de peso-animal/dia para camundongos (MEZADRI et al., 2004) e o volume do bebedouro (200mL).

4.4.8. Avaliação da viabilidade e do poder de infecção do *T. cruzi*

A avaliação da viabilidade do *T. cruzi* foi analisada em camundongos imunodeficientes isogênicos *scid* mediante a infecção experimental pela polpa de açaí contaminada com formas tripomastigotas metacíclicas do parasito e a observação durante a fase aguda da doença de Chagas.

O poder de infecção do *T. cruzi* foi analisado por meio da administração dos inóculos em grupos de camundongos relacionados a cada tipo de tratamento térmico testado e por meio de três diferentes vias de inoculação (infecção via i.p., gavagem e oral) (Figuras 10, 11 e 12).



Figura 10. Infecção i.p. **Figura 11.** Infecção por gavagem **Figura 12.** Infecção oral (arquivo pessoal). (arquivo pessoal). (arquivo pessoal).

4.4.8.1. Verificação da parasitemia e da mortalidade

O número de parasitos circulantes na infecção aguda foi determinado pela contagem de tripomastigotas presentes em amostras de 5 μ L de sangue, por meio de pequena secção da ponta da cauda dos camundongos, segundo metodologia preconizada por Brener (1962), durante cinco dias consecutivos, a se iniciar a partir da data da constatação da infecção experimental.

Todos os animais foram observados por um período mínimo de 40 dias e a mortalidade foi registrada diariamente.

4.4.9. As amostras

Todos os procedimentos, desde a coleta dos parasitos até as infecções experimentais, foram realizados em câmara de fluxo laminar.

A composição das amostras utilizadas nos ensaios *in vitro* e *in vivo* é descrita a seguir:

4.4.9.1. Controle negativo

Alíquotas contendo somente polpa *in natura* de açaí foram homogeneizadas manualmente e em seguida, submetidas à temperatura de refrigeração (4°C) ou ao processo de congelamento em *freezer* (-20°C) ou ainda, mantidas à temperatura ambiente por períodos de até 144 horas.

Após o tratamento térmico, quando necessário, as misturas foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas manualmente; e seu volume total utilizado para a infecção experimental pela via oral. Dada a necessidade, após o descongelamento e a homogeneização manual, outras amostras passaram pelo processo de tamisação forçada e o eluato obtido foi inoculado pelas vias intraperitoneal ou por gavagem.

4.4.9.2. Controle positivo

Frações de plasma contaminado com 10^5 tripomastigotas com a cepa Y de *T. cruzi*, obtido de animais CBA/JUnib, foram homogeneizadas manualmente e observadas por microscopia óptica comum, em triplicata, segundo o método de Brener (1962). As formas tripomastigotas foram classificadas de acordo com os critérios de motilidade preestabelecidos, para confirmação da sua viabilidade em relação aos períodos de incubação e tratamento térmico ao quais seriam submetidas.

Posteriormente, diferentes amostras do plasma contaminado foram mantidas à temperatura ambiente ou à temperatura de refrigeração (4°C) ou ainda, submetidas ao processo de congelamento em *freezer* (-20°C) por períodos de até 144 horas.

Logo em seguida, as alíquotas foram descongeladas à temperatura ambiente, quando necessário, e após nova homogeneização manual, as lâminas preparadas foram examinadas, em triplicata, seguindo a metodologia anteriormente descrita. As formas tripomastigotas foram quantificadas e classificadas de acordo com critérios de motilidade preestabelecidos (bem ativo, ativo ou lento), para a

avaliação da sobrevivência do parasito, dados o período de incubação e tratamento térmico aos quais foram submetidas.

Finalmente, o volume total restante de plasma mantido por diferentes períodos de incubação (por até 144 horas), foi individualmente utilizado para a infecção experimental, obedecendo a via de administração de cada grupo experimental, de modo a permitir a avaliação da virulência e do poder de infecção do parasito.

4.4.9.3. Grupos teste: eluato

Os grupos teste foram constituídos pelas misturas compostas de polpa de açaí e de formas tripomastigotas, respectivamente, na proporção 1:3.

Três partes de plasma contaminado com 10^5 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, obtido de animais CBA/JUnib, foram homogeneizadas manualmente e analisadas por microscopia óptica comum, em triplicata, segundo o método de Brener (1962) para determinar a quantidade de parasitos existentes na mistura a ser formada com a polpa.

Em seguida, uma parte de polpa de açaí foi adicionada a cada alíquota de plasma. As misturas formadas foram devidamente homogeneizadas manualmente e mantidas à temperatura ambiente ou submetidas à temperatura de refrigeração (4°C) ou ainda, ao processo de congelamento em *freezer* (-20°C) por períodos de até 144 horas.

Após o tratamento térmico, as misturas foram descongeladas à temperatura ambiente, quando necessário, e em seguida a nova homogeneização manual, foi realizado o processo de tamisação forçada.

O produto obtido da tamisação foi homogeneizado manualmente e a inspeção direta das formas tripomastigotas foi determinada quantitativamente, de acordo com os critérios de motilidade preestabelecidos, em triplicata, com 5µL cada, em lâminas examinadas por microscopia óptica comum, seguindo a metodologia proposta por Brener (1962), para a avaliação da sobrevivência do parasito, dadas as condições de tratamento.

Logo em seguida, foram feitas duas lavagens sucessivas para cada coluna de tamisação com solução de NaCl 0,15M. O conteúdo juntou-se ao eluato já recolhido e, finalmente, após nova homogeneização manual, o volume total foi utilizado na infecção experimental, obedecendo à via de administração de cada grupo experimental.

4.4.9.4. Grupos teste: mistura

O tratamento dado ao grupo teste mistura foi semelhante ao procedimento adotado para o grupo teste eluato. As amostras que continham a mistura total não passaram pelo processo de tamisação forçada e foram administradas aos animais apenas pela via oral.

4.4.10. Os grupos experimentais

Inicialmente, foi utilizado um número reduzido de animais distribuídos em grupos experimentais variados, classificados de acordo com a esterilização ou não da polpa, com o período de incubação e com o tratamento térmico adotado para as misturas.

A escolha das metodologias mais adequadas e a padronização das técnicas, logo após a realização dos experimentos preliminares, permitiram a definição de grupos experimentais conforme indicado abaixo (Tabelas 1, 2 e 3), para a realização do tratamento estatístico dos dados obtidos e da análise da evolução da parasitemia, reagrupados de acordo a via de administração e temperatura de incubação (Anexo 9.1).

Tabela 1. Formação do grupo experimental utilizando polpa *in natura*, com a mistura mantida por 24 horas à temperatura ambiente, demonstrando as variáveis e o número de animais.

Condição da polpa de açaí	Tempo e temperatura de incubação da mistura	Volume do inóculo/ animal	Inóculo	Via de administração	Número de animais	
					Macho	Fêmea
<i>In natura</i>	24 h Temperatura ambiente	100 µL	Controle	i.p.	1	1
			Negativo (Eluato)	Gavagem	1	1
				Oral	1	1
			Controle	i.p.	1	1
			Positivo	Gavagem	1	1
				Oral	1	1
			Grupo Teste (Eluato)	i.p.	5	5
				Gavagem	5	5
				Oral	5	5
			Grupo Teste (Mistura)	Oral	5	5

Tabela 2. Formação do grupo experimental utilizando polpa *in natura*, com a mistura mantida por 24 horas à 4°C, demonstrando as variáveis e o número de animais.

Condição da polpa de açaí	Tempo e temperatura de incubação da mistura	Volume do inóculo/ animal	Inóculo	Via de administração	Número de animais	
					Macho	Fêmea
<i>In natura</i>	24 h 4°C	100 µL	Controle	i.p.	1	1
			Negativo (Eluato)	Gavagem	1	1
				Oral	1	1
			Controle	i.p.	1	1
			Positivo	Gavagem	1	1
				Oral	1	1
			Grupo Teste (Eluato)	i.p.	5	5
				Gavagem	5	5
				Oral	5	5
			Grupo Teste (Mistura)	Oral	5	5

Tabela 3. Formação do grupo experimental utilizando polpa *in natura*, com a mistura mantida por 24 horas à -20°C, demonstrando as variáveis e o número de animais.

Condição da polpa de açai	Tempo e temperatura de incubação da mistura	Volume do inóculo/ animal	Inóculo	Via de administração	Número de animais	
					Macho	Fêmea
<i>In natura</i>	24 h -20°C	100 µL	Controle	i.p.	1	1
			Negativo (Eluato)	Gavagem	1	1
				Oral	1	1
			Controle	i.p.	1	1
			Positivo	Gavagem	1	1
				Oral	1	1
			Grupo Teste (Eluato)	i.p.	5	5
				Gavagem	5	5
				Oral	5	5
			Grupo Teste (Mistura)	Oral	5	5

4.5. Análise estatística

Os resultados da análise de sobrevivência do *Trypanosoma cruzi* foram expressos em porcentagem de sobrevivência, em relação à motilidade e ao tempo de exposição na polpa de açai.

Para os testes da virulência do parasito, os valores foram submetidos a análises de média e desvio padrão considerando a constatação da infecção experimental e a data da mortalidade dos animais, expressa em dias após a infecção (d.a.i.).

A análise estatística dos grupos experimentais foi realizada pelo *software Statistical Analysis System (SAS)* para *Windows* (2007), utilizando ANOVA quatro fatores para o teste de Comparações Múltiplas *a posteriori* de *Duncan*, com 99% de confiança.

5. RESULTADOS

Seguem os resultados obtidos durante os ensaios *in vivo* e *in vitro* envolvendo a polpa de açaí contaminada por *T. cruzi*, mantidos por diferentes períodos de incubação e submetidos a diferentes tratamentos térmicos.

5.1. Pré-teste

Por um lado, o depósito de 10^5 formas de tripomastigotas diretamente na polpa de açaí não permitiu a visualização dos parasitos durante a inspeção microscópica, com e sem coloração vital pelo Azul de *Trypan*.

Por outro lado, a utilização do sobrenadante da polpa de açaí permitiu a visualização dos parasitos com sua motilidade característica. A observação de 100% das formas tripomastigotas bem ativas indicou que o contato com a polpa não promoveu a morte imediata do parasito, tampouco nos 15, 30, 45 e 60 minutos seguintes.

5. 2. Testes de isolamento das formas de *T. cruzi* na polpa de açaí

Os resultados foram analisados de maneira qualitativa, visando avaliar a eficiência do método no isolamento das formas de *T. cruzi* da polpa açaí.

5. 2. 1. Método de centrifugação

Após a centrifugação, foi possível a observação dos parasitos em ensaios com volumes reduzidos da mistura, porém o rendimento dessa técnica foi muito baixo e, por isso, a metodologia em questão não se mostrou eficiente no isolamento dos parasitos.

5. 2. 2. Método da tamisação forçada

O método que se mostrou adequado ao isolamento de tripomastigotas presentes na mistura foi a tamisação forçada. Os resultados demonstraram que a

pequena pressão exercida sobre a mistura facilitou a separação das fases sólida e líquida da polpa. Paralelamente, a técnica proporcionou a livre passagem dos parasitos ao longo da coluna e permitiu que eles fossem obtidos em sua totalidade junto na fase líquida, por meio da coleta do eluato.

5.3. Avaliação da interferência da polpa de açaí na sobrevivência do *T. cruzi*: testes *in vitro*

A avaliação da interferência da polpa de açaí na sobrevivência do *T. cruzi* foi realizada por meio de testes *in vitro*, utilizando polpa de açaí autoclavada e *in natura*, mantida por diferentes períodos de incubação e tratamentos térmicos.

5.3.1. Sobrevivência do *T. cruzi* em polpa de açaí autoclavada e mantida à temperatura ambiente:

A mistura de polpa de açaí e plasma com *T. cruzi* (1:3) contendo 10^5 tripomastigotas foi mantida à temperatura ambiente por 6, 18, 24, 42 e 48 horas para a observação de parasitos em movimento.

Após a tamisação forçada da mistura, os eluatos foram analisados por microscopia óptica comum segundo os critérios de motilidade adotados. Após 6 horas de incubação, 100% dos tripomastigotas estavam bem ativos; após 18 horas, 70,0% estavam bem ativos e 30,0% ativos; após 24 horas, 60,0% estavam ativos e 40,0% lentos; após 42 horas foram encontrados 33,3% ativos e 66,7% lentos e após 48 horas, 100% lentos (Tabela 4).

Tabela 4. Sobrevivência da cepa Y do *T. cruzi* na mistura com polpa de açaí autoclavada e contaminada com 10^5 tripomastigotas na proporção 1:3, observada no tempo inicial e após um período de incubação de até 48 horas, mantida à temperatura ambiente.

Motilidade	Grupo Teste (Eluato)				
	6 h (%)	18 h (%)	24 h (%)	42 h (%)	48 h (%)
Bem Ativo (BA)	100	70,0	0	0	0
Ativo (A)	0	30,0	60,0	33,3	0
Lento (L)	0	0	40,0	66,7	100

5.3.2. Sobrevivência do *T. cruzi* em polpa *in natura* de açaí e mantida a 4°C

A sobrevivência de formas tripomastigotas na polpa de açaí mantida a 4°C foi observada por períodos de 7, 24, 30, 48 e 144 horas.

Foi utilizada a mesma proporção da mistura (1:3) com 10^5 tripomastigotas e após 7 horas, os eluatos obtidos apresentaram 100% de tripomastigotas bem ativos; após 24 horas, 50,0% bem ativos, 42,0% ativos e 8,0% lentos; após 30 horas, 40,0% bem ativos e 60,0% ativos; após 48 horas, 54,5% bem ativos e 45,5% ativos e após 144 horas, 100% ativos (Tabela 5).

Tabela 5. Sobrevivência da cepa Y do *T. cruzi* na mistura com polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas na proporção 1:3, observada no tempo inicial e após um período de incubação de até 144 horas, mantida a 4°C.

Motilidade	Grupo Teste (Eluato)				
	7 h (%)	24 h (%)	30 h (%)	48 h (%)	144 h (%)
Bem Ativo (BA)	100	50,0	40,0	54,5	0
Ativo (A)	0	42,0	60,0	45,5	100
Lento (L)	0	8,0	0	0	0

5.3.3. Sobrevivência do *T. cruzi* em polpa *in natura* de açaí e mantida a -20°C

Considerando o período de incubação de até 26 horas, não foram encontrados parasitos no eluato das misturas descongeladas.

5.4. Avaliação da interferência da polpa de açaí na virulência do *T. cruzi*: testes *in vivo*

A influência do contato com a polpa de açaí sobre a integridade, viabilidade e virulência do *T. cruzi* foi analisada por meio de experimentos *in vivo*.

5.4.1. Mistura produzida com a polpa de açaí autoclavada e mantida à temperatura ambiente

O *T. cruzi* misturado à polpa de açaí autoclavada e mantida à temperatura ambiente preservou sua virulência, em 100% dos animais *scid*, por até 7 horas. Nos controles negativos, não houve constatação de DCA e morte. Após 3 horas, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, em dias após a infecção, respectivamente, $4,0 \pm 1,0$ e $11,0 \pm 1,0$ (i.p.); $7,0 \pm 2,0$ e $14,0 \pm 3,0$ (gavagem) e $9,0 \pm 2,0$ e $15,0 \pm 2,0$ (oral). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $7,0 \pm 1,0$ e $13,0 \pm 0,0$ (i.p.); $9,0 \pm 0,0$ e $16,0 \pm 0,0$ (gavagem) e $12,0 \pm 2,0$ e $18,0 \pm 2,0$ (oral). Após 5 horas, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, $7,0 \pm 1,0$ e $15,0 \pm 2,0$ (i.p.); $9,0 \pm 1,0$ e $17,0 \pm 2,0$ (gavagem) e $13,0 \pm 1,0$ e $19,0 \pm 3,0$ (oral). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $8,0 \pm 0,0$ e $17,0 \pm 1,0$ (i.p.); $11,0 \pm 0,0$ e $20,0 \pm 1,0$ (gavagem) e $12,0 \pm 1,0$ e $20,0 \pm 1,0$ (oral). Após 7 horas, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, $7,0 \pm 2,0$ e $18,0 \pm 3,0$ (i.p.); $10,0 \pm 2,0$ e $20,0 \pm 0,0$ (gavagem) e $12,0 \pm 2,0$ e $21,0 \pm 1,0$ (oral). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $8,0 \pm 1,0$ e $19,0 \pm 2,0$ (i.p.); $12,0 \pm 0,0$ e $22,0 \pm 1,0$ (gavagem) e $14,0 \pm 2,0$ e $23,0 \pm 2,0$ (oral). Já os animais do grupo teste que receberam a mistura total pela via oral apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $14,0 \pm 1,0$ e $23,0 \pm 1,0$

(Tabela 6), sendo observado um retardo na parasitemia da infecção oral em relação às demais vias de administração.

Tabela 6. Resultados da constatação da infecção pelo tempo de início da parasitemia e de mortalidade em camundongos *scid* infectados por diferentes vias de inoculação com polpa de açaí autoclavada e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, mantida por 3, 5 e 7 horas à temperatura ambiente.

Período de Incubação (h)	Inóculo	Via	N° infectados / N° inoculados	% de infecção	Constatação da DCA* (d.a.i.)**	Mortalidade (d.a.i.)
3	Controle	i.p.	0 / 1	0	Negativo	0
	Negativo	Gavagem	0 / 1	0	Negativo	0
	(Eluato)	Oral	0 / 1	0	Negativo	0
	Controle	i.p.	2 / 2	100	4,0±1,0	11,0±1,0
	Positivo	Gavagem	2 / 2	100	7,0±2,0	14,0±3,0
		Oral	2 / 2	100	9,0±2,0	15,0±2,0
	Grupo	i.p.	2 / 2	100	7,0±1,0	13,0±0,0
	Teste	Gavagem	2 / 2	100	9,0±0,0	16,0±0,0
	(Eluato)	Oral	2 / 2	100	12,0±2,0	18,0±2,0
5	Controle	i.p.	0 / 1	0	Negativo	0
	Negativo	Gavagem	0 / 1	0	Negativo	0
	(Eluato)	Oral	0 / 1	0	Negativo	0
	Controle	i.p.	2 / 2	100	7,0±1,0	15,0±2,0
	Positivo	Gavagem	2 / 2	100	9,0±1,0	17,0±2,0
		Oral	2 / 2	100	13,0±1,0	19,0±3,0
	Grupo	i.p.	2 / 2	100	8,0±0,0	17,0±1,0
	Teste	Gavagem	2 / 2	100	11,0±0,0	20,0±1,0
	(Eluato)	Oral	2 / 2	100	12,0±1,0	20,0±1,0

[Continuação Tabela 6]

	Controle	i.p.	0 / 1	0	Negativo	0
	Negativo	Gavagem	0 / 1	0	Negativo	0
	(Eluato)	Oral	0 / 1	0	Negativo	0
	Controle	i.p.	2 / 2	100	7,0±2,0	18,0±3,0
	Positivo	Gavagem	2 / 2	100	10,0±2,0	20,0±0,0
		Oral	2 / 2	100	12,0±2,0	21,0±1,0
7	Grupo	i.p.	2 / 2	100	8,0±1,0	19,0±2,0
	Teste	Gavagem	2 / 2	100	12,0±0,0	22,0±1,0
	(Eluato)	Oral	2 / 2	100	14,0±2,0	23,0±2,0
	Grupo					
	Teste	Oral	2 / 2	100	14,0±1,0	23,0±1,0
	(Mistura)					

* DCA: doença de Chagas aguda

** d.a.i.: dias após infecção

5.4.2. Tratamento combinado: mistura produzida com a polpa *in natura* de açai e mantida à temperatura ambiente e a 4°C

Um grupo de animais recebeu tratamento combinado em que a mistura permaneceu por 48 horas à temperatura ambiente e depois foi mantida por 72 horas a 4°C, em geladeira.

No controle negativo, não houve constatação de DCA e morte. No controle positivo, a virulência foi preservada em 100% dos animais. O início da parasitemia e a morte foram, respectivamente, 7,0±0,0 e 16,0±0,0 (i.p.). No grupo teste, a virulência foi preservada em 50,0% dos animais. O início da parasitemia e morte foram, respectivamente, nos dias 16,0±2,0 e 22,0±1,0 (i.p.) (Tabela 7).

Tabela 7. Resultados da constatação da infecção pelo tempo de início da parasitemia e de mortalidade em camundongos *scid* infectados por diferentes vias de inoculação com polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, utilizando-se tratamento térmico combinado, mantida à temperatura ambiente por 48 horas e posteriormente por 72 horas a 4°C.

Inóculo	Via	N° infectados / N° inoculados	% de infecção	Constatação da DCA* (d.a.i.)**	Mortalidade (d.a.i.)
Controle Negativo (Eluato)	i.p.	0 / 2	0	Negativo	0
Controle Positivo	i.p.	2 / 2	100	7,0±0,0	16,0±0,0
Grupo Teste (Eluato)	i.p.	2 / 4	50	16,0±2,0	22,0±1,0

* DCA: doença de Chagas aguda

** d.a.i.: dias após infecção

5.4.3. Mistura produzida com a polpa *in natura* de açaí e mantida a 4°C

Além das análises *in vivo* com a polpa autoclavada, foram realizados testes com a polpa *in natura* contaminada com o *T. cruzi* por até 144 horas.

T. cruzi misturado à polpa de açaí *in natura* e mantida a 4°C preservou sua virulência, em 100% dos animais *scid*, por até 144 horas. Nos controles negativos, não houve constatação de DCA e morte. Após 3 horas, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, 7,0±2,0 e 17,0±1,0 (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 8,0±2,0 e

17,0±2,0 (i.p.). Após 7 horas, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, 8,0±2,0 e 18,0±1,0 (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 11,0±1,0 e 19,0±2,0 (i.p.). Após 24 horas, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, 10,0±2,0 e 19,0±3,0 (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 11,0±3,0 e 20,0±2,0 (i.p.). Após 30 horas, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, 10,0±2,0 e 19,0±2,0 (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 10,0±3,0 e 18,0±1,0 (i.p.). Após 48 horas, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, 10,0±1,0 e 19,0±1,0 (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 10,0±2,0 e 18,0±1,0 (i.p.). Após 94 horas, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, 10,0±2,0 e 19,0±1,0 (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 11,0±3,0 e 21,0±2,0 (i.p.). Após 144 horas, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, 10,0±1,0 e 18,0±3,0 (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 9,0±3,0 e 19,0±2,0 (i.p.) (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados da constatação da infecção pelo tempo de início da parasitemia e de mortalidade em camundongos *scid* infectados por diferentes vias de inoculação com polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, mantida por 3, 7, 24, 30, 48, 94 e 144 horas a 4°C.

Período de Incubação (h)	Inóculo	Via	N° infectados / N° inoculados	% de infecção	Constatação da DCA* (d.a.i.)**	Mortalidade (d.a.i.)
3	Controle Negativo (Eluato)	i.p.	0 / 2	0	Negativo	0
	Controle Positivo	i.p.	2 / 2	100	7,0±2,0	17,0±1,0
	Grupo Teste (Eluato)	i.p.	4 / 4	100	8,0±2,0	17,0±2,0
7	Controle Negativo (Eluato)	i.p.	0 / 2	0	Negativo	0
	Controle Positivo	i.p.	4 / 4	100	8,0±2,0	18,0±1,0
	Grupo Teste (Eluato)	i.p.	4 / 4	100	11,0±1,0	19,0±2,0

[Continuação Tabela 8]

24	Controle					
	Negativo (Eluato)	i.p.	0 / 2	0	Negativo	0
	Controle	i.p.	4 / 4	100	10,0±2,0	19,0±3,0
24	Positivo					
	Grupo					
	Teste (Eluato)	i.p.	4 / 4	100	11,0±3,0	20,0±2,0
30	Controle					
	Negativo (Eluato)	i.p.	0 / 2	0	Negativo	0
	Controle	i.p.	4 / 4	100	10,0±2,0	19,0±2,0
30	Positivo					
	Grupo					
	Teste (Eluato)	i.p.	4 / 4	100	10,0±3,0	18,0±1,0
48	Controle					
	Negativo (Eluato)	i.p.	0 / 2	0	Negativo	0
	Controle	i.p.	2 / 2	100	10,0±1,0	19,0±1,0
48	Positivo					
	Grupo					
	Teste (Eluato)	i.p.	4 / 4	100	10,0±2,0	18,0±1,0

[Continuação Tabela 8]

94	Controle Negativo (Eluato)	i.p.	0 / 2	0	Negativo	0
	Controle Positivo	i.p.	4 / 4	100	10,0±2,0	19,0±1,0
	Grupo Teste (Eluato)	i.p.	4 / 4	100	11,0±3,0	21,0±2,0
144	Controle Negativo (Eluato)	i.p.	0 / 2	0	Negativo	0
	Controle Positivo	i.p.	4 / 4	100	10,0±1,0	18,0±3,0
	Grupo Teste (Eluato)	i.p.	4 / 4	100	9,0±3,0	19,0±2,0

* DCA: doença de Chagas aguda

** d.a.i.: dias após infecção

5.4.4. Mistura produzida com a polpa autoclavada e polpa *in natura* de açaí mantidas a -20°C

Foram realizados, ainda, testes com polpa autoclavada e polpa *in natura*, contaminadas com o *T. cruzi* e submetidas ao processo de congelamento (-20°C) por 26 horas.

O *T. cruzi* misturado à polpa de açaí autoclavada e mantida a -20°C preservou sua virulência, em 100% dos animais *scid*, por até 7 horas (i.p.). Nos controles negativos, não houve constatação de DCA e morte. Após 4 horas, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, 9,0±0,0 e 22,0±0,0 (i.p.). Os animais do grupo teste que

receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $7,0 \pm 1,0$ e $16,0 \pm 1,0$ (i.p.). Após 5 horas, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, $8,0 \pm 0,0$ e $17,0 \pm 0,0$ (i.p.) e $11,0 \pm 2,0$ e $20,0 \pm 3,0$ (gavagem). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $10,0 \pm 3,0$ e $17,0 \pm 2,0$ (i.p.). Após 7 horas de congelamento, a virulência do *T. cruzi* foi preservada em 50% dos animais (gavagem). No controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, $7,0 \pm 0,0$ e $15,0 \pm 0,0$ (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $11,0 \pm 1,0$ e $19,0 \pm 1,0$ (i.p.) e $11,0 \pm 1,0$ e $19,0 \pm 2,0$ (gavagem). Após 14 horas de congelamento, a virulência do *T. cruzi* foi preservada em 75% do controle positivo e em 25% do grupo teste (i.p.). No controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, $10,0 \pm 2,0$ e $18,0 \pm 3,0$ (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $12,0 \pm 0,0$ e $20,0 \pm 0,0$ (i.p.) (Tabela 9).

O *T. cruzi* misturado à polpa *in natura* de açaí e mantida a -20°C preservou sua virulência, em 100% dos animais *scid*, por até 7 horas (i.p.). Nos controles negativos, não houve constatação de DCA e morte. Após 3 horas, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, $6,0 \pm 0,0$ e $15,0 \pm 0,0$ (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $8,0 \pm 1,0$ e $18,0 \pm 2,0$ (i.p.) e $11,0 \pm 2,0$ e $21,0 \pm 3,0$ (oral). Após 5 horas, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, $8,0 \pm 1,0$ e $15,0 \pm 2,0$ (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $8,0 \pm 1,0$ e $18,0 \pm 1,0$ (i.p.). Após 7 horas de congelamento, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, $6,0 \pm 1,0$ e $18,0 \pm 0,0$ (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $8,0 \pm 0,0$ e

18,0±0,0 (i.p.). Após 14 horas de congelamento, a virulência do *T. cruzi* foi preservada em 50% do controle positivo e do grupo teste (i.p.). No controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, 7,0±0,0 e 19,0±0,0 (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 8,0±0,0 e 19,0±0,0 (i.p.). Após 21 horas de congelamento, a virulência do *T. cruzi* também foi preservada em 50% do controle positivo e do grupo teste (i.p.). No controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, 9,0±0,0 e 19,0±0,0 (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 15,0±0,0 e 24,0±0,0 (i.p.). Após 24 horas de congelamento, a virulência do *T. cruzi* foi preservada em 100% do controle positivo e em 50% do grupo teste (i.p.). No controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, 11,0±1,0 e 20,0±1,0 (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 13,0±0,0 e 24,0±0,0 (i.p.). Após 26 horas de congelamento, a virulência do *T. cruzi* também foi preservada em 100% do controle positivo e em 50% do grupo teste (i.p.). No controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, 10,0±1,0 e 18,0±2,0 (i.p.). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 11,0±0,0 e 21,0±0,0 (i.p.) (Tabela 10).

Tabela 9. Resultados da constatação da infecção pelo tempo de início da parasitemia e de mortalidade em camundongos *scid* infectados por diferentes vias de inoculação com polpa de açaí autoclavada e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:4, mantida durante 4, 5, 7 e 14 horas a -20°C .

Período de Incubação (h)	Inóculo	Via	N° infectados/ N° inoculados	% de infecção	Constatação da DCA* (d.a.i.)**	Mortalidade (d.a.i.)
4	Controle Negativo (Eluato)	i.p.	0 / 1	0	Negativo	0
	Controle Positivo	i.p.	4 / 4	100	9,0±0,0	22,0±0,0
	Grupo Teste (Eluato)	i.p.	4 / 4	100	7,0±1,0	16,0±1,0
	Controle Negativo (Eluato)	i.p.	0 / 1	0	Negativo	0
5	Controle Positivo	Gavagem	0 / 1	0	Negativo	0
	Controle Positivo	i.p.	4 / 4	100	8,0±0,0	17,0±0,0
	Controle Positivo	Gavagem	4 / 4	100	11,0±2,0	20,0±3,0
	Grupo Teste (Eluato)	i.p.	4 / 4	100	10,0±3,0	17,0±2,0

[Continuação Tabela 9]

	Controle	i.p.	0 / 1	0	Negativo	0
	Negativo	Gavagem	0 / 1	0	Negativo	0
	(Eluato)					
7	Controle	i.p.	4 / 4	100	7,0±0,0	15,0±0,0
	Positivo					
	Grupo	i.p.	4 / 4	100	11,0±1,0	19,0±1,0
	Teste	Gavagem	2 / 4	50	11,0±1,0	19,0±2,0
	(Eluato)					
<hr/>						
	Controle					
	Negativo	i.p.	0 / 1	0	Negativo	0
	(Eluato)					
14	Controle	i.p.	3 / 4	75	10,0±2,0	18,0±3,0
	Positivo					
	Grupo					
	Teste	i.p.	1 / 4	25	12,0±0,0	20,0±0,0
	(Eluato)					

* DCA: doença de Chagas aguda

** d.a.i.: dias após infecção

Tabela 10. Resultados da constatação da infecção pelo tempo de início da parasitemia e de mortalidade em camundongos *scid* infectados por diferentes vias de inoculação com polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, mantida durante 3, 5, 7, 14, 21, 24 e 26 horas a -20°C .

Período de Incubação (h)	Inóculo	Via	N° infectados / N° inoculados	% de infecção	Constatação da DCA* (d.a.i.)**	Mortalidade (d.a.i.)
3	Controle Negativo (Eluato)	i.p.	0 / 1	0	Negativo	0
		Oral	0 / 1	0	Negativo	0
	Controle Positivo	i.p.	2 / 2	100	6,0±0,0	15,0±0,0
	Grupo Teste (Eluato)	i.p.	2 / 2	100	8,0±1,0	18,0±2,0
		Oral	2 / 2	100	11,0±2,0	21,0±3,0
5	Controle Negativo (Eluato)	i.p.	0 / 1	0	Negativo	0
	Controle Positivo	i.p.	2 / 2	100	8,0±1,0	15,0±2,0
	Grupo Teste (Eluato)	i.p.	2 / 2	100	8,0±1,0	18,0±1,0

[Continuação Tabela 10]

	Controle					
	Negativo	i.p.	0 / 1	0	Negativo	0
	(Eluato)					
7	Controle	i.p.	2 / 2	100	6,0±1,0	18,0±0,0
	Positivo					
	Grupo Teste					
	(Eluato)	i.p.	2 / 2	100	8,0±0,0	18,0±0,0
<hr/>						
	Controle					
	Negativo	i.p.	0 / 1	0	Negativo	0
	(Eluato)					
14	Controle	i.p.	1 / 2	50	7,0±0,0	19,0±0,0
	Positivo					
	Grupo Teste					
	(Eluato)	i.p.	1 / 2	50	8,0±0,0	19,0±0,0
<hr/>						
	Controle					
	Negativo	i.p.	0 / 1	0	Negativo	0
	(Eluato)					
21	Controle	i.p.	1 / 2	50	9,0±0,0	19,0±0,0
	Positivo					
	Grupo Teste					
	(Eluato)	i.p.	1 / 2	50	15,0±0,0	24,0±0,0

[Continuação Tabela 10]

24	Controle					
	Negativo	i.p.	0 / 1	0	Negativo	0
	(Eluato)					
	Controle	i.p.	2 / 2	100	11,0±1,0	20,0±1,0
26	Positivo					
	Grupo					
	Teste	i.p.	1 / 2	50	13,0±0,0	24,0±0,0
	(Eluato)					
26	Controle					
	Negativo	i.p.	0 / 1	0	Negativo	0
	(Eluato)					
	Controle	i.p.	2 / 2	100	10,0±1,0	18,0±2,0
26	Positivo					
	Grupo					
	Teste	i.p.	1 / 2	50	11,0±0,0	21,0±0,0
	(Eluato)					

* DCA: doença de Chagas aguda

** d.a.i.: dias após infecção

5.4.5. Grupos experimentais: misturas produzidas com a polpa *in natura* de açaí contaminada e mantidas por 24 horas sob diferentes tratamentos térmicos

Os experimentos preliminares utilizaram um pequeno número de animais por grupo, com o objetivo de definir as metodologias mais adequadas, a padronização das técnicas, bem como os tratamentos térmicos e os períodos de incubação a que o parasito seria submetido na polpa de açaí. Após a definição das estratégias, foram formados os grupos experimentais para permitir o tratamento estatístico.

Na análise da preservação da virulência dos *T. cruzi* misturados à polpa de açaí *in natura* e mantidos por 24 horas, houve diferença significativa ($p < 0,0001$) em relação às vias de administração testadas, com retardo maior registrado no início da parasitemia da infecção oral, independente do tratamento térmico ou do período de incubação da mistura contaminada.

Os resultados da análise da sobrevivência demonstraram que 100% de formas tripomastigotas permaneceram bem ativas nos controles positivos e nos grupos teste (eluato e mistura) durante o período inicial de incubação das misturas à temperatura ambiente, a 4°C e -20°C. Já no controle positivo, após 24 horas de incubação à temperatura ambiente, foram encontrados 87,3% tripomastigotas bem ativos, 11,4% ativos e 1,3% lentos; a 4°C, 76,5% bem ativos e 23,5% ativos. Para os grupos teste (eluato), após 24 horas de incubação à temperatura ambiente, foram encontrados 88,2% bem ativos e 11,8% ativos e a 4°C, 55,1% bem ativos, 38,8% ativos e 6,1% lentos. Não foram encontrados tripomastigotas nas amostras mantidas a -20°C e o grupo teste mistura (após 24 horas) não pôde ser analisado (Tabela 11).

Na análise da virulência do *T. cruzi*, para o tratamento térmico da mistura à temperatura ambiente por 24 horas, no controle positivo, 100% dos animais apresentaram infecção, com início da parasitemia e a morte, respectivamente, nos dias $4,0 \pm 0,0$ e $15,0 \pm 0,0$ (i.p.); $8,0 \pm 0,0$ e $17,0 \pm 0,0$ (gavagem) e $11,0 \pm 1,0$ e $19,0 \pm 2,0$ (oral). No grupo teste, os animais que receberam o eluato da tamisação apresentaram infecção com início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $7,0 \pm 1,0$ e $16,0 \pm 2,0$ (90% pela i.p.); $11,0 \pm 2,0$ e $17,0 \pm 2,0$ (40% por gavagem) e $16,0 \pm 0,0$ e $21,0 \pm 0,0$ (20% pela via oral). Além disso, 20% dos animais que receberam a mistura total pela via oral também apresentaram infecção, com início de parasitemia e morte, respectivamente, em $14,0 \pm 3,0$ e $21,0 \pm 4,0$ (Tabela 12).

Para o tratamento térmico da mistura a 4°C, após 24 horas, no controle positivo, 100% dos animais apresentaram infecção, com início de parasitemia e a morte, respectivamente, nos dias $6,0 \pm 1,0$ e $16,0 \pm 0,0$ (i.p.); $11,0 \pm 0,0$ e $21,0 \pm 0,0$ (gavagem) e $12,0 \pm 2,0$ e $22,0 \pm 3,0$ (oral). No grupo teste, os animais que receberam o eluato da tamisação apresentaram infecção com início de

parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $10,0\pm 3,0$ e $19,0\pm 4,0$ (90,0% pela i.p.); $12,0\pm 2,0$ e $21,0\pm 4,0$ (60,0% por gavagem) e $14,0\pm 1,0$ e $22,0\pm 1,0$ (20,0% pela via oral). Além disso, 20,0% dos animais que receberam a mistura total pela via oral também apresentaram infecção, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $11,0\pm 0,0$ e $21,0\pm 0,0$ (Tabela 13).

Para o tratamento térmico da mistura a -20°C , após 24 horas, no controle positivo, os animais apresentaram infecção, com início de parasitemia e a morte, respectivamente, nos dias $10,0\pm 1,0$ e $20,0\pm 1,0$ (100% pela i.p.); $14,0\pm 0,0$ e $25,0\pm 0,0$ (50,0% por gavagem) e $13,0\pm 0,0$ e $25,0\pm 0,0$ (50,0% pela via oral). No grupo teste, os animais que receberam o eluato da tamisação apresentaram infecção com início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $13,0\pm 1,0$ e $24,0\pm 1,0$ (20,0% pela i.p.); $13,0\pm 0,0$ e $20,0\pm 0,0$ (10,0% por gavagem) e $14,0\pm 0,0$ e $22,0\pm 0,0$ (10,0% pela via oral). Além disso, 10,0% dos animais que receberam a mistura total pela via oral também apresentaram infecção, com início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $15,0\pm 0,0$ e $22,0\pm 0,0$ (Tabela 14).

Tabela 11. Sobrevivência da cepa Y do *T. cruzi* na mistura com polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas na proporção 1:3, observada no tempo inicial e após um período de incubação de 24 horas, mantida à temperatura ambiente, 4°C ou -20°C.

Temperatura de incubação	Motilidade	0 hora			24 horas		
		Controle Positivo (%)	Grupo Teste (Eluato) (%)	Grupo Teste (Mistura) (%)	Controle Positivo (%)	Grupo Teste (Eluato) (%)	Grupo Teste (Mistura) (%)
Ambiente	Bem Ativo (BA)	100,0	100,0	100,0	87,3	88,2	-*
	Ativo (A)	0	0	0	11,4	11,8	-
	Lento (L)	0	0	0	1,3	0	-
4°C	Bem Ativo (BA)	100,0	100,0	100,0	76,5	55,1	-
	Ativo (A)	0	0	0	23,5	38,8	-
	Lento (L)	0	0	0	0	6,1	-
-20°C	Bem Ativo (BA)	100,0	100,0	100,0	0	0	-
	Ativo (A)	0	0	0	0	0	-
	Lento (L)	0	0	0	0	0	-

* -: Não Observado (a coloração escura da mistura não permitiu a visualização dos tripomastigotas).

Tabela 12. Resultados da constatação da infecção pelo tempo de início da parasitemia e de mortalidade em camundongos *scid* infectados por diferentes vias de inoculação com polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, mantida durante 24 horas à temperatura ambiente. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança).

Inóculo	Via	N° infectados / N° inoculados	% de infecção	Constatação da DCA* (d.a.i.)**	Mortalidade (d.a.i.)
Controle	i.p.	0 / 2	0	Negativo	0
Negativo	Gavagem	0 / 2	0	Negativo	0
(Eluato)	Oral	0 / 2	0	Negativo	0
Controle	i.p.	2 / 2	100	4,0±0,0 (a)	15,0±0,0
Positivo	Gavagem	2 / 2	100	8,0±0,0 (b)	17,0±0,0
	Oral	2 / 2	100	11,0±1,0 (c)	19,0±2,0
Grupo	i.p.	9 / 10	90	7,0±1,0 (a)	16,0±2,0
Teste	Gavagem	4 / 10	40	11,0±2,0 (b)	17,0±2,0
	(Eluato) Oral	2 / 10	20	16,0±0,0 (c)	21,0±0,0
Grupo	Oral	2 / 10	20	14,0±3,0 (c)	21,0±4,0
(Mistura)					

* DCA: doença de Chagas aguda

** d.a.i.: dias após infecção

Tabela 13. Resultados da constatação da infecção pelo tempo de início da parasitemia e de mortalidade em camundongos *scid* infectados por diferentes vias de inoculação com polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, mantida em refrigeração durante 24 horas a 4°C. Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança).

Inóculo	Via	N° infectados / N° inoculados	% de infecção	Constatação da DCA* (d.a.i.)**	Mortalidade (d.a.i.)
Controle	i.p.	0 / 2	0	Negativo	0
Negativo	Gavagem	0 / 2	0	Negativo	0
(Eluato)	Oral	0 / 2	0	Negativo	0
Controle	i.p.	2 / 2	100	6,0±1,0 (a)	16,0±0,0
Positivo	Gavagem	2 / 2	100	11,0±0,0 (b)	21,0±0,0
	Oral	2 / 2	100	12,0±2,0 (c)	22,0±3,0
Grupo	i.p.	9 / 10	90	10,0±3,0 (a)	19,0±4,0
Teste	Gavagem	6 / 10	60	12,0±2,0 (b)	21,0±4,0
	(Eluato) Oral	2 / 10	20	14,0±1,0 (c)	22,0±1,0
Grupo	Oral	2 / 10	20	11,0±0,0 (c)	21,0±0,0
(Mistura)					

* DCA: doença de Chagas aguda

** d.a.i.: dias após infecção

Tabela 14. Resultados da constatação da infecção pelo tempo de início da parasitemia e de mortalidade em camundongos *scid* infectados por diferentes vias de inoculação com polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, mantida congelada durante 24 horas a -20°C . Valores representam a média e o desvio-padrão que seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de *Duncan*, 99% de confiança).

Inóculo	Via	N° infectados / N° inoculados	% de infecção	Constatação da DCA* (d.a.i.)**	Mortalidade (d.a.i.)
Controle	i.p.	0 / 2	0	Negativo	0
Negativo	Gavagem	0 / 2	0	Negativo	0
(Eluato)	Oral	0 / 2	0	Negativo	0
Controle	i.p.	2 / 2	100	10,0±1,0 (a)	20,0±1,0
Positivo	Gavagem	1 / 2	50	14,0±0,0 (b)	25,0±0,0
	Oral	1 / 2	50	13,0±0,0 (c)	25,0±0,0
Grupo	i.p.	2 / 10	20	13,0±1,0 (a)	24,0±1,0
Teste	Gavagem	1 / 10	10	13,0±0,0 (b)	20,0±0,0
	(Eluato) Oral	1 / 10	10	14,0±0,0 (c)	22,0±0,0
Grupo	Oral	1 / 10	10	15,0±0,0 (c)	22,0±0,0
(Mistura)					

* DCA: doença de Chagas aguda

** d.a.i.: dias após infecção

5.4.5.1. Evolução da parasitemia dos grupos experimentais

Os resultados da evolução da parasitemia podem ser visualizados nos gráficos (Figuras 13 a 21), que foram plotados de acordo com cada grupo experimental (A a I). Para ilustrar como ocorre a curva parasitêmica da infecção

por *T. cruzi* em animais *scid* (ALVES, 1998), a parasitemia foi realizada por cinco dias consecutivos a partir da constatação da infecção.

Dentro de cada grupo, nos casos em que mais de um animal se infectou, apenas um animal foi representado, com a média da parasitemia. No entanto, os valores exatos do número de parasitos, de todos os animais, em relação ao dia após infecção encontram-se na seção Anexo 9.1 (Tabelas 15 a 23).

No grupo experimental A (Figura 13), a constatação da infecção ocorreu no 4º d.a.i. para os controles positivos (macho e fêmea) e a parasitemia foi realizada até o 8º d.a.i. Nos grupos teste eluato (macho e fêmea), a média da constatação da infecção ocorreu no 7º d.a.i. e, em média, a parasitemia foi realizada até o 11º d.a.i.

No grupo experimental B (Figura 14), a constatação da infecção ocorreu no 8º d.a.i. para os controles positivos (macho e fêmea) e a parasitemia foi realizada até o 12º d.a.i. Nos grupos teste eluato (macho e fêmea), a média da constatação da infecção ocorreu no 11º d.a.i. e, em média, a parasitemia foi realizada até o 15º d.a.i.

No grupo experimental C (Figura 15), a constatação da infecção ocorreu nos 10º e 11º d.a.i., respectivamente, para os controles positivos macho e fêmea e a parasitemia foi realizada, respectivamente, até o 14º e 15º d.a.i. Nos grupos teste eluato (macho e fêmea), a média da constatação da infecção ocorreu no 16º d.a.i. e, em média, a parasitemia foi realizada até o 20º d.a.i. No grupo teste mistura, a constatação da infecção ocorreu, em média, no 11º d.a.i. e, em média, a parasitemia foi realizada até o 15º d.a.i.

No grupo experimental D (Figura 16), a constatação da infecção ocorreu nos 5º e 7º d.a.i., respectivamente, para os controles positivos fêmea e macho e a parasitemia foi realizada, respectivamente, até o 9º e 11º d.a.i. Nos grupos teste eluato (macho e fêmea), a média da constatação da infecção ocorreu no 10º d.a.i. e, em média, a parasitemia foi realizada até o 14º d.a.i.

No grupo experimental E (Figura 17), a constatação da infecção ocorreu no 11º d.a.i. para os controles positivos (macho e fêmea) e a parasitemia foi realizada até o 15º d.a.i. Nos grupos teste eluato (macho e fêmea), a média da constatação

da infecção ocorreu no 12º d.a.i. e, em média, a parasitemia foi realizada até o 16º d.a.i.

No grupo experimental F (Figura 18), a constatação da infecção ocorreu nos 10º e 14º d.a.i., respectivamente, para os controles positivos fêmea e macho e a parasitemia foi realizada, respectivamente, até o 14º e 18º d.a.i. Nos grupos teste eluato fêmea e macho, respectivamente, a constatação da infecção ocorreu no 14º e 15º d.a.i. e a parasitemia foi realizada, respectivamente, até o 18º e 19º d.a.i. No grupo teste mistura (macho e fêmea), a constatação da infecção ocorreu no 11º d.a.i. e a parasitemia foi realizada até o 15º d.a.i.

No grupo experimental G (Figura 19), a constatação da infecção ocorreu nos 10º e 11º d.a.i., respectivamente, para os controles positivos macho e fêmea e a parasitemia foi realizada, respectivamente, até o 14º e 15º d.a.i. No grupo teste eluato (fêmea), a constatação da infecção ocorreu, em média, no 13º d.a.i. e a parasitemia foi realizada até o 17º d.a.i.

No grupo experimental H (Figura 20), a constatação da infecção ocorreu no 14º d.a.i. para o controle positivo (fêmea) e a parasitemia foi realizada até o 18º d.a.i. No grupo teste eluato (macho), a constatação da infecção ocorreu no 13º d.a.i. e a parasitemia foi realizada até o 17º d.a.i.

No grupo experimental I (Figura 21), a constatação da infecção ocorreu no 13º d.a.i. para o controle positivo (macho) e a parasitemia foi realizada até o 17º d.a.i. No grupo teste eluato (macho), a constatação da infecção ocorreu no 14º d.a.i. e a parasitemia foi realizada até o 18º d.a.i. No grupo teste mistura (fêmea), a constatação da infecção ocorreu no 15º d.a.i. e a parasitemia foi realizada até o 19º d.a.i.

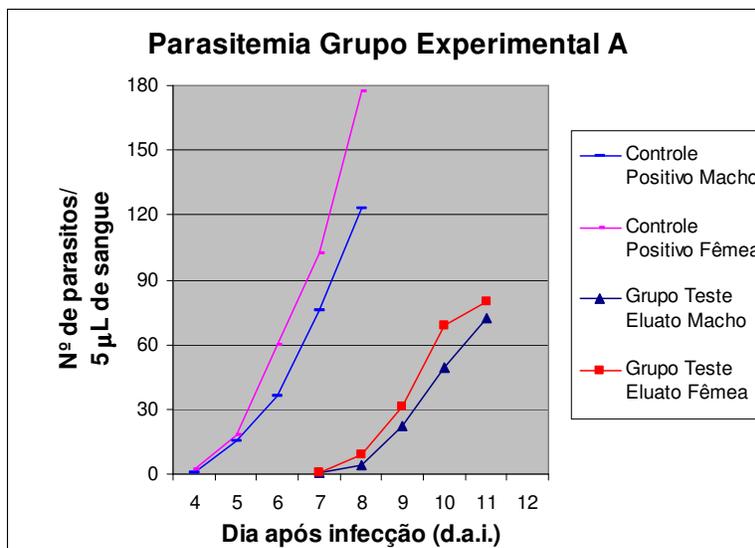


Figura 13. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via intraperitoneal com eluato da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, mantida por 24 horas à temperatura ambiente (Grupo Experimental A).

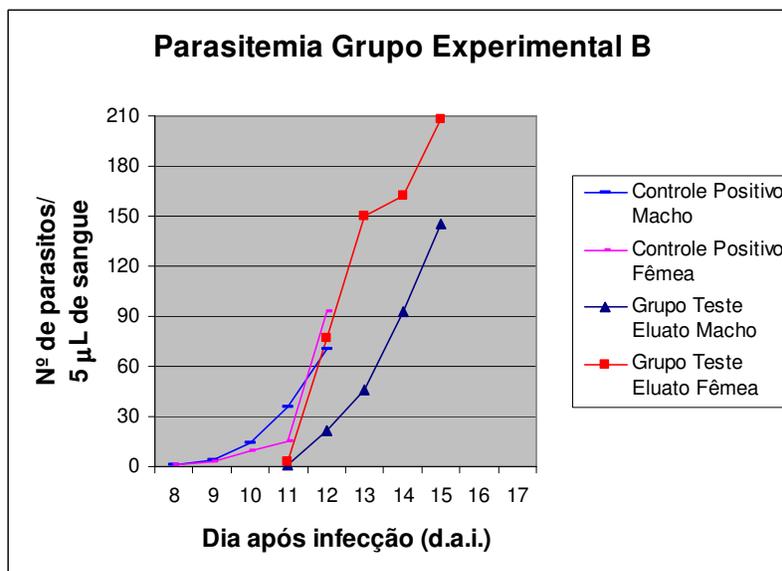


Figura 14. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via gavagem com eluato da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, mantida por 24 horas a temperatura ambiente (Grupo Experimental B).

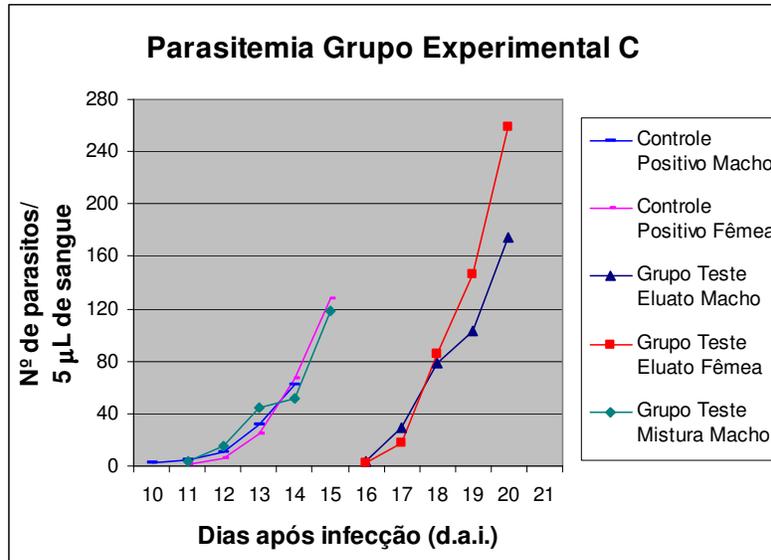


Figura 15. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via oral com eluato ou mistura total da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, mantida por 24 horas à temperatura ambiente (Grupo Experimental C).

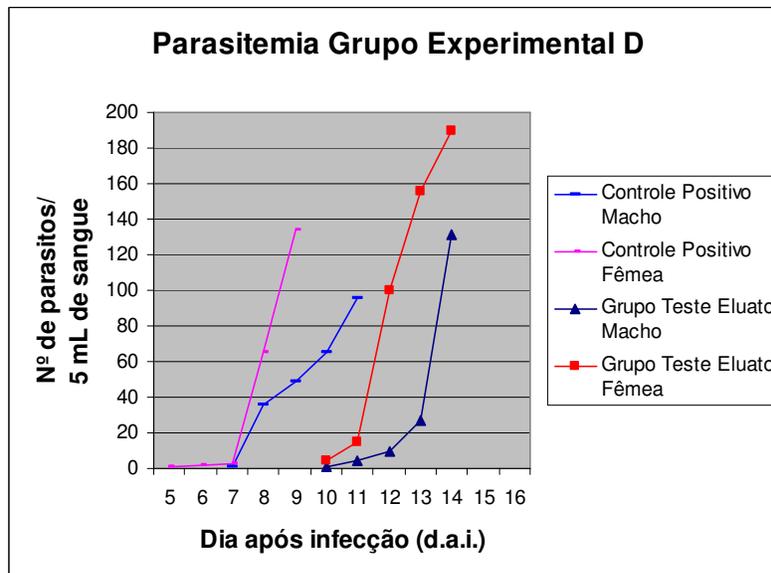


Figura 16. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via intraperitoneal com eluato da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, mantida por 24 horas a 4°C (Grupo Experimental D).

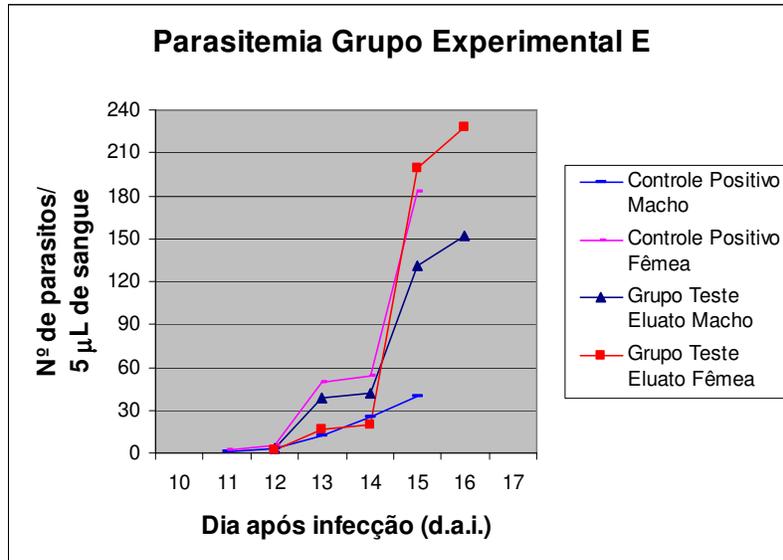


Figura 17. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via gavagem com eluato da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, mantida por 24 horas a 4°C (Grupo Experimental E).

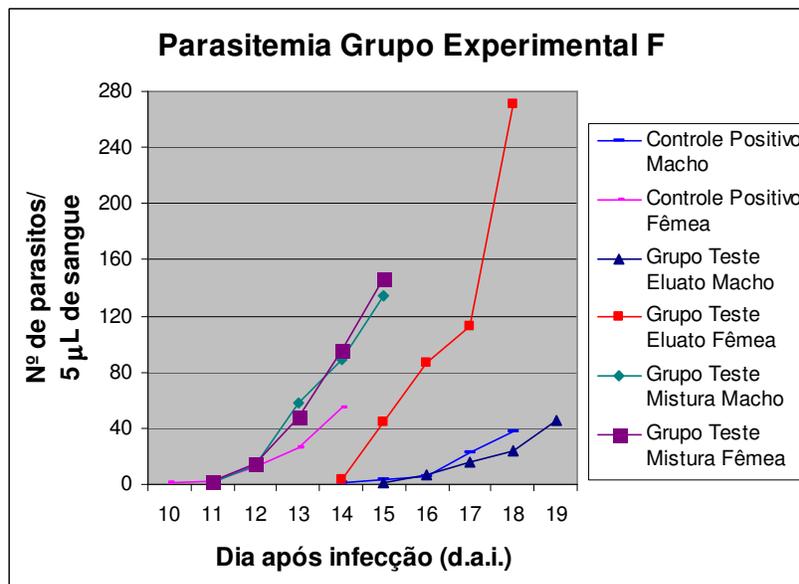


Figura 18. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via oral com eluato ou mistura total da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, mantida por 24 horas a 4°C (Grupo Experimental F).

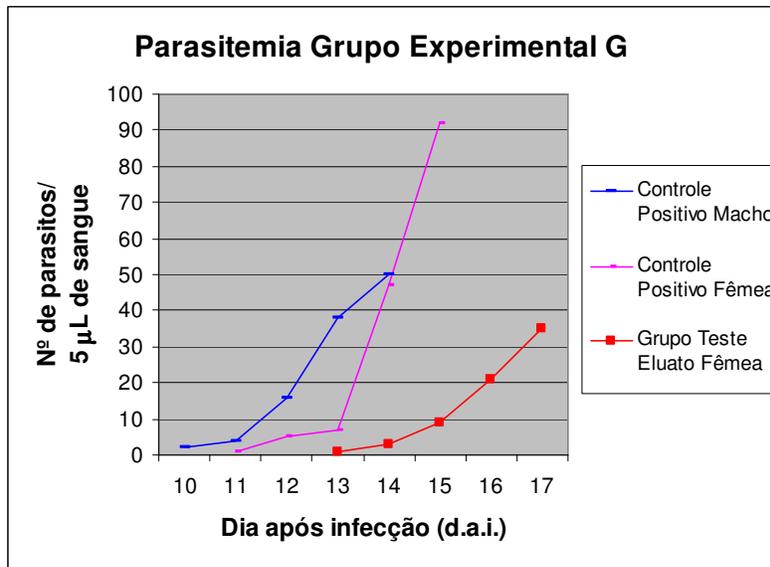


Figura 19. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via intraperitoneal com eluato da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, mantida por 24 horas a -20°C (Grupo Experimental G).

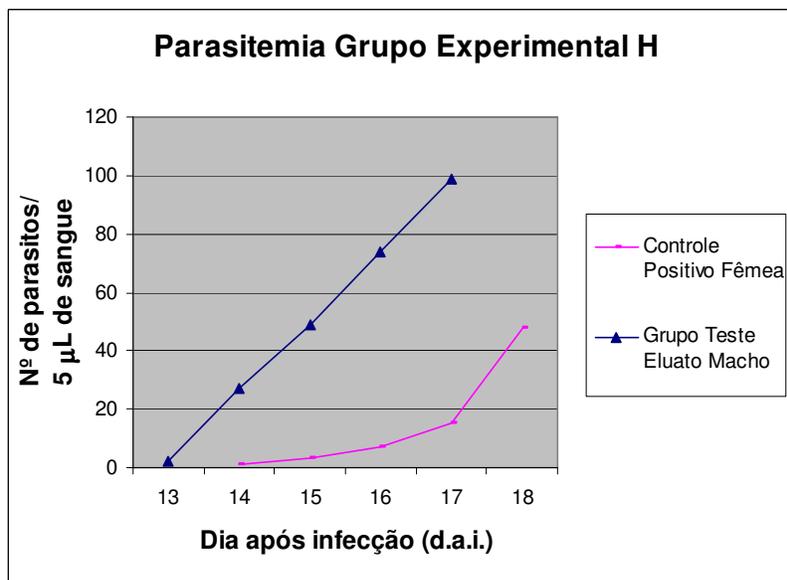


Figura 20. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via gavagem com eluato da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, mantida por 24 horas a -20°C (Grupo Experimental H).

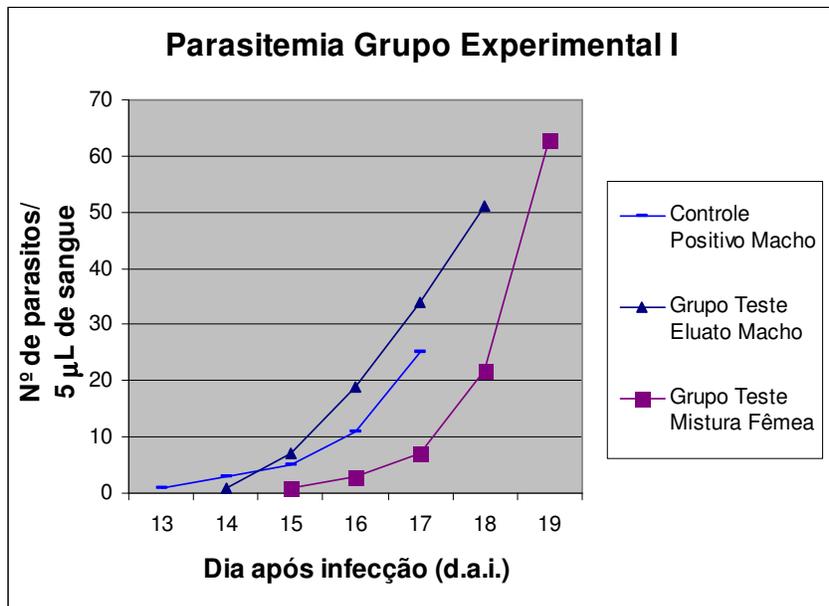


Figura 21. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via oral com eluato ou mistura total da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção 1:3, mantida por 24 horas a -20°C (Grupo Experimental I).

6. DISCUSSÃO

A transmissão oral da doença de Chagas experimental tem sido evidenciada pela ingestão de diversos alimentos, dado que o *Trypanosoma cruzi* mostrou-se viável por, pelo menos, algumas horas, à temperatura ambiente, prolongando-se por dias ou semanas, em baixas temperaturas (AMATO-NETO et al., 2000; DIAS, 2006).

Experimentos realizados por Mayer (1961) demonstraram a infecção de camundongos, cães e gatos pela ingestão de leite contaminado com excrementos de *Triatoma infestans*, após 24 horas de exposição à temperatura ambiente.

Lainson et al. (1980) contaminaram uma variedade de alimentos com suspensões de epimastigotas: leite pasteurizado, feijão cozido, pedaços de peixe, carne bovina e arroz, suco de manga, queijo com goiabada e farinha de mandioca. Foi possível observar a sobrevivência do *T. cruzi* por até 3 horas nos alimentos mantidos a temperaturas entre 26°C e 28°C, sendo confirmada a hipótese de transmissão via oral, com a constatação de 100% dos camundongos infectados.

Calvo-Méndez et al. (1994) observaram a transmissão da DCA pela via oral a camundongos por meio da administração de diversos alimentos como água potável, leite pasteurizado, carne moída crua ou cozida, queijo fresco e arroz cozido, todos contaminados com fezes de *Triatoma pallidipennis*. Os autores admitiram variação na eficiência da infecção de acordo com o tipo de alimento.

Soares et al. (1987) demonstraram a viabilidade do parasito no caldo de cana por até 24 horas e, mais recentemente, Castanho et al. (2002) relataram a infecção chagásica experimental em camundongos pela ingestão da garapa contaminada com fezes de *Rhodnius neglectus* contendo *T. cruzi*.

A contaminação de alimentos pelo *T. cruzi* pode ocorrer principalmente quando triatomíneos depositam suas fezes infectadas na superfície de alimentos ou de ingredientes alimentícios ou quando esses triatomíneos são triturados com os alimentos, especialmente durante o processamento de sucos de frutas.

Essa é a principal hipótese apontada para explicar diversos surtos que ocorreram nos últimos anos na região Norte do Brasil, associados à ingestão de suco de açaí possivelmente contaminado com o parasito (VALENTE et al., 2002).

Na região amazônica, considerando que o açazeiro não é ecótopo do vetor, a forma de contaminação do açaí está associada à falta de higiene durante a colheita, debulha, o transporte, processamento, armazenamento e/ou a comercialização do fruto, sendo que as condições de transporte do fruto até o batedor favorecem sua contaminação por fezes de triatomíneos infectados (VALENTE et al., 2002).

O transporte do fruto entre a colheita e o processamento é realizado em sacos ou cestos conhecidos como paneiros, destampados ou descobertos, com a temperatura em seu interior podendo chegar a 35°C. Se tampados ou cobertos, a elevada umidade aumenta a evapotranspiração do fruto e contribui para a sua deterioração mais rápida (ROGEZ, 2000).

De igual relevância na epidemiologia da transmissão alimentar da DCA é a contaminação de equipamentos, utensílios e do ambiente de transporte e processamento do alimento, seja pela urina ou por secreções anais de marsupiais, seja por fezes de triatomíneos infectados, dada a invasão humana ao ambiente silvestre (PANAFTOSA, 2006; 2009). Estudos constataram ser esta como sendo uma importante via de contaminação, ao serem relatados dois surtos da doença associados à contaminação do caldo de cana no Brasil (SHIKANAI-YASUDA et al., 1991; IANNI & MADY, 2005).

Assim, há muitas fontes de contaminação e não apenas a polpa de açaí deve ser considerada como alimento de alto risco. Além do suco de açaí, muitos alimentos considerados como importantes fontes de calorias e nutrientes, fontes de trabalho e com relevância para o turismo e para a gastronomia típica regional podem ser veículos eficazes para a transmissão da DCA. O suco de cana de açúcar, a carne e o leite crus, o vinho de palmeira e outros frutos amazônicos como patauá, buriti e bacaba podem ser contaminados geralmente em áreas onde há reservatórios de *T. cruzi* e/ou triatomíneos infectados, quando medidas de segurança alimentar não são adotadas em qualquer das etapas de sua cadeia produtiva artesanal ou comercial. Portanto, esses alimentos não oferecem riscos de caráter primário e sua produção ou seu consumo, dentro de condições sanitárias adequadas, não devem sofrer restrições (PANAFTOSA, 2006).

Em contrapartida, ganhou fundamental importância o estudo da relação parasito - polpa de açaí, uma vez que nos últimos anos, o açaí tem sido o alimento associado ao maior número de casos de DCA na região amazônica (SVS, 2007b).

De acordo com Dias (2006), na Amazônia, cerca de 70% das 59 microepidemias registradas até 2005 ocorreram de agosto a dezembro. Segundo comunicação pessoal com os agentes da SESPA, as regiões produtoras de açaí, principalmente a região da Ilha de Marajó, concentram anualmente o maior número de casos de contaminação oral, que aumentam consideravelmente no segundo semestre e se estendem até o final do verão. Esse fato se deve à época de safra do açaí e à celebração do Círio de Nazaré, que atrai muitos turistas para a cidade de Belém. Embora não associados à contaminação do açaí, os episódios da DCA na Paraíba e em Santa Catarina ocorridos, respectivamente, nos meses de outubro e fevereiro, obedeceram ao mesmo padrão. Segundo Dias (2006), períodos quentes são de maior atividade biológica de triatomíneos e isso implica em maiores densidades vetor - *T. cruzi* nos ecótopos naturais e artificiais, prevalecendo os estádios alados. Há mais mobilidade dos vetores, mais hematofagismo, mais contaminação do ambiente com fezes infectadas e maior incidência de casos humanos agudos pela via vetorial clássica e oral.

Nas regiões produtoras, a polpa de açaí é ácida (pH 5,3) e comercializada *in natura*, isto é, sem pasteurização, normalmente à temperatura ambiente quando é consumida imediatamente ou após curto período sob refrigeração (ROGEZ, 2000).

Quando se destina aos comércios distantes, a polpa artesanal é congelada, pois é altamente perecível e de fácil deterioração (MENEZES, 2005). Os fatores responsáveis por essa alta perecibilidade são de natureza microbiana (SOUSA et al., 1999), além da degradação enzimática e química, ocasionando reações de oxidação, redução dos teores de antocianinas e despigmentação da polpa, responsáveis pelas alterações de cor e pelo aparecimento do sabor azedo. À temperatura ambiente, sua durabilidade é de poucas horas e, sob refrigeração, o tempo máximo de conservação é de 12 horas (ROGEZ, 2000).

Apesar disso, nesta pesquisa, o período de incubação da polpa de açaí, submetida a diferentes tratamentos térmicos foi variado, sendo estabelecido, após os testes preliminares, o período de 24 horas para a realização dos grupos experimentais porque este corresponde a um dia inteiro e considera um aspecto cultural relativo ao consumo da polpa na região Norte do Brasil: ela é consumida em períodos próximos ou durante o período das refeições e em diferentes horários ao longo do dia. Convém ressaltar, ainda, a existência de diferentes tipos de percepções ao sabor ácido, que se acentua na polpa quanto maior for a diferença de tempo entre o momento da preparação e o do consumo. Para algumas pessoas, a polpa ainda é palatável e até melhor apreciada, enquanto para outras, quando se encontra no mesmo estágio, a polpa já é descartada pelo sabor azedo característico (ROGEZ, 2000).

Estudos anteriores demonstraram que após 24 horas em outros alimentos, à temperatura ambiente, como o leite (DIAZ-UNGRÍA, 1968) e o caldo de cana, o parasito ainda manteve sua viabilidade em camundongos imunocompetentes, inoculados por meio de sonda gástrica (SOARES et al., 1987; PINTO et al., 1990).

Inicialmente, uma avaliação em curto prazo foi realizada com o propósito de excluir a possibilidade de morte imediata do *T. cruzi* após o contato com a polpa de açaí íntegra ou com o seu sobrenadante.

A não visualização dos parasitos diretamente na polpa de açaí íntegra durante a inspeção microscópica foi associada principalmente à sua coloração escura, dada a grande quantidade de matéria orgânica e antocianinas (ROGEZ, 2000).

Em contrapartida, a observação de 100% de formas tripomastigotas bem ativas no sobrenadante da polpa de açaí indicou que, apesar de o pH ideal para o parasito estar entre 7,2 e 7,3 (sangue de mamíferos e luz do tubo digestório de insetos) e haver morte celular em meios muito ácidos ou alcalinos (DIAZ-UNGRÍA, 1968; SOARES et al., 1987), o parasito sobreviveu em meio ácido na polpa *in natura* de açaí (pH 5,3) produzida em Belém (PA). Esses resultados sugeriram a presença de elementos protetores e indicaram que ensaios de sobrevivência do parasito na polpa de açaí deveriam ser realizados.

No presente trabalho, para a realização dos ensaios de sobrevivência do parasito, foram feitos testes preliminares a fim de se buscar uma metodologia adequada ao isolamento e à observação de tripomastigotas íntegros e em movimento na polpa de açaí. Os elevados índices de matéria orgânica aliados às características físico-químicas da polpa íntegra (ROGEZ, 2000) limitaram a visualização dos tripomastigotas pelo método da centrifugação, indicando que novos métodos de isolamento do parasito deveriam ser realizados.

A tamisação forçada possibilitou a identificação da motilidade característica dos tripomastigotas por microscopia óptica comum, por meio da observação do volume total de eluato recolhido, livre dos resíduos da polpa, para que posteriormente pudesse ser administrado nos animais. Além disso, a administração do eluato foi uma estratégia adotada para viabilizar os ensaios de infecção experimental pelas vias i.p. e por gavagem, dada a impossibilidade da aplicação do produto em sua íntegra e da alta viscosidade da polpa de açaí, respectivamente.

Em seguida aos testes iniciais que demonstraram que os parasitos não morreram imediatamente após o contato com a polpa de açaí, foram realizados experimentos com o objetivo de identificar o tempo máximo em que ainda era possível a observação de formas tripomastigotas em movimento. Para tanto, a avaliação da interferência da polpa de açaí na sobrevivência do *T. cruzi* foi realizada por meio de testes *in vitro*, utilizando polpas de açaí autoclavada e *in natura* mantidas por diferentes períodos de incubação e tratamentos térmicos.

Rogez (2000) relatou que o processo de autoclavagem a 121°C por 15 minutos conduz a uma perda de aproximadamente metade do conteúdo de polifenóis e antocianinas da polpa de açaí. Apesar das modificações nas propriedades sensoriais e físico-químicas da polpa decorrentes do processo de autoclavagem, os nossos resultados demonstraram que a sobrevivência dos parasitos não foi comprometida. Depois de a polpa autoclavada e contaminada ser mantida à temperatura ambiente por 48 horas, foram encontrados 100% tripomastigotas lentos (Tabela 4) e em relação à polpa *in natura* mantida

refrigerada a 4°C, após 144 horas foram observados 100% tripomastigotas ativos (Tabela 5).

Ao comparar a polpa de açaí autoclavada e a polpa de açaí *in natura*, ambas contaminadas e mantidas durante 24 horas à temperatura ambiente, tem-se que na polpa autoclavada foram encontrados 60% de tripomastigotas ativos e 40% lentos (Tabela 4); já na polpa *in natura* o resultado, por sua vez, foi de 88,2% de tripomastigotas bem ativos e 11,8% lentos (Tabela 11). Nesse sentido, o microambiente da polpa *in natura* pareceu proporcionar condições ainda mais favoráveis à motilidade do parasito.

Nos experimentos preliminares, a polpa *in natura* mantida a 4°C por 24 horas apresentou 50% de tripomastigotas bem ativos, 42% ativos e 8% lentos (Tabela 5). Posteriormente, nas mesmas condições de temperatura e durante o mesmo período de incubação, os resultados encontrados foram semelhantes às amostras submetidas à análise da virulência nos grupos experimentais, com 55,1% de tripomastigotas bem ativos, 38,8% ativos e 6,1% lentos (Tabela 11).

Em contrapartida, não foram encontrados parasitos no eluato das misturas descongeladas de polpa *in natura* após serem mantidas congeladas a -20°C. Esse fato se deve possivelmente a não observação da totalidade do eluato, pois alíquotas de 5µL, em triplicata, foram analisadas por microscopia óptica comum, sendo o volume restante utilizado na infecção experimental. Outra hipótese provável é que o congelamento foi capaz de matar ou inativar grande quantidade de parasitos ali presentes, mas não necessariamente sua totalidade.

Estudos anteriores já demonstraram a sobrevivência do *T. cruzi* em diferentes meios, tipos de alimentos, períodos de tempo, temperaturas e umidade.

Soares & Marsden (1978) provaram que o *T. cruzi* pode permanecer infectante em insetos vetores mortos mantidos à temperatura de 10°C durante seis dias e, também, entre 26°C a 30°C por até dois meses, demonstrando que a sua viabilidade pode variar conforme as condições de umidade, temperatura e dessecação do meio em que se encontra.

Soares et al. (1986) relataram que em baixa umidade o parasito perdeu a motilidade e a infectividade em 30 minutos e, ao contrário, em ambientes com alta umidade, esses parâmetros foram preservados por até 30 minutos a 33°C.

Añez & Crisante (2008) estudaram a sobrevivência do *T. cruzi* em diversos alimentos, entre eles, banana, pêssego, cana de açúcar, mamão, maçã, batata, cenoura e tomate, todos armazenados a temperatura de 26°C. Os resultados indicaram que, em 73% das amostras, os parasitos permaneceram vivos por um período entre 6 e 72 horas, sendo estimado o maior número de parasitos vivos entre 6 e 18 horas após a contaminação. Apenas em abacaxi contaminado (pH 3) não houve sobrevivência do *T. cruzi*.

A avaliação da capacidade da polpa de açaí para atuar na preservação da virulência dos tripomastigotas recuperados da mistura e, conseqüentemente, para provocar infecção chagásica aguda e morte, exigiu testes *in vivo* utilizando camundongos certificados.

Os ensaios foram realizados empregando-se camundongos isogênicos imunodeficientes da linhagem *scid*. Essa linhagem é deficiente de linfócitos funcionais T e B (BOSMA et al., 1983). Alves (1998) já havia demonstrado a curva parasitêmica característica e a mortalidade de 100% dos *scid* quando infectados experimentalmente (i.p.) com 10² tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*.

Essa sensibilidade foi capaz de denunciar a presença de quantidades mínimas de *T. cruzi* com virulência preservada também na polpa de açaí, simulando situações extremas e livre da ação do sistema imune. A mortalidade na fase aguda ocorreu em 100% dos animais que adquiriram a doença, independentemente da esterilização ou não da polpa, da forma de tratamento térmico ou do período de incubação da polpa.

A polpa de açaí comercializada na região Norte apresenta elevados índices de contaminação sanitária. Segundo comunicação pessoal com o Dr. Hervé Rogez, da Universidade Federal do Pará, a polpa *in natura* de açaí comercializada na cidade de Belém (PA) apresenta alta taxa de salmonela (15% das amostras), coliformes totais e fecais (maior que 1,1 UFC) e fungos (5,24 UFC).

Por essa razão, os ensaios para avaliação da interferência da polpa tanto na sobrevivência como na virulência do *T. cruzi* foram conduzidos utilizando polpa previamente submetida ao processo de autoclavagem e também polpa *in natura*, forma normalmente consumida pela população local.

Fundamentalmente, para ambos os tratamentos da polpa, os mesmos protocolos experimentais foram utilizados, exceto pela adoção de um esquema prévio de cobertura com antibiótico nos animais que receberam a polpa *in natura*.

A antibioticoterapia foi adotada considerando a possibilidade do efeito prejudicial das bactérias da polpa *in natura* aos resultados experimentais, a fim de anular possíveis fatores de interferência na morte dos animais.

De maneira geral, os resultados obtidos na avaliação da interferência da polpa de açaí na virulência do *T. cruzi* demonstraram que tanto o processo de autoclavagem quanto a polpa de açaí *in natura* não comprometeram a virulência do parasito e que todas as vias de administração, todos os períodos de incubação e tratamentos térmicos testados foram eficientes na preservação da virulência do parasito. Não houve morte no controle negativo, o que permitiu desconsiderar possíveis fatores de interferência ou contaminações externos aos experimentos.

O *T. cruzi* misturado à polpa de açaí autoclavada e mantida à temperatura ambiente preservou sua virulência, em 100% dos animais, por até 7 horas. Para esse período de incubação máximo testado e dadas as condições de esterilização da polpa e tratamento térmico, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, 7,0±2,0 e 18,0±3,0 (i.p.); 10,0±2,0 e 20,0±0,0 (gavagem) e 12,0±2,0 e 21,0±1,0 (oral). Os animais do grupo teste que receberam o eluato da tamisação apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 8,0±1,0 e 19,0±2,0 (i.p.); 12,0±0,0 e 22,0±1,0 (gavagem) e 14,0±2,0 e 23,0±2,0 (oral). Já os animais do grupo teste que receberam a mistura total pela via oral apresentaram início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 14,0±1,0 e 23,0±1,0 (Tabela 6).

A administração da mistura total e do eluato permitiu comparações pela via de transmissão oral. Resultados semelhantes validaram o processo de tamisação forçada e que associada às lavagens da coluna com solução NaCl 0,15M

indicaram que não houve perdas consideráveis seja de polpa de açaí, seja de parasitos. O descarte da hipótese da adesão de parasitos à lã de *nylon* e às microesferas, ao permitir a livre passagem dos parasitos ao longo da coluna, demonstrou a eficiência desse método de separação na avaliação da virulência do *T. cruzi* na DCA por meio da transmissão alimentar.

Por ser o açaí um alimento consumido de formas muito variadas (OLIVEIRA et al., 2002), foi realizado um teste com a finalidade de avaliar possíveis modificações nas características da polpa de açaí ao longo de um período, em condições extremas de consumo, introduzindo a manutenção da polpa em temperaturas distintas e a influência dessas mudanças de temperatura na viabilidade do tripomastigota. Assim, o *T. cruzi* misturado à polpa de açaí *in natura* e submetida a tratamento térmico combinado preservou sua virulência, em 100% dos animais, durante 120 horas, sendo 48 horas de exposição à temperatura ambiente e, em seguida, 72 horas de exposição a 4°C. No controle positivo, o início da parasitemia e a morte foram, respectivamente, nos dias 7,0±0,0 e 16,0±0,0 (i.p.). Os animais grupo teste apresentaram início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 16,0±2,0 e 22,0±1,0 (i.p.) (Tabela 7).

O *T. cruzi* misturado à polpa de açaí *in natura* e mantida a 4°C preservou sua virulência, em 100% dos animais, por até 144 horas.

Para 144 horas de incubação, no controle positivo, o início da parasitemia e a morte dos animais foram, respectivamente, nos dias 10,0±1,0 e 18,0±3,0 (i.p.). Os animais do grupo teste apresentaram início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 9,0±3,0 e 19,0±2,0 (i.p.) (Tabela 8). O retardo observado na parasitemia do controle positivo em relação ao grupo teste sugeriu um possível efeito crioprotetor da polpa sobre o parasito especificamente nas condições em que os testes foram realizados, seja pela associação do tratamento térmico e/ou período de incubação da polpa.

Apesar da não visualização dos tripomastigotas durante os testes de sobrevivência *in vitro* após o congelamento da mistura em todos os períodos de incubação testados, ensaios *in vivo* realizados com a polpa de açaí contaminada e submetida ao processo de congelamento a -20°C, com taxa de decréscimo de

temperatura de 1,8°C/minuto, indicaram que o parasito manteve sua virulência por até 14 horas na polpa autoclavada e por até 26 horas na polpa *in natura*.

Para a polpa autoclavada, após 14 horas, no controle positivo, 75% dos animais apresentaram infecção, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 10,0±2,0 e 18,0±3,0 (i.p.). No grupo teste, 25% dos animais apresentaram infecção, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 12,0±0,0 e 20,0±0,0 (i.p.) (Tabela 9).

Segundo Amato-Neto et al. (1975), o *T. cruzi* permaneceu viável em plasma a -20°C, entre 3 e 24 horas. Nossos resultados indicaram a viabilidade do parasito em plasma sanguíneo congelado por um período de tempo ainda maior, uma vez que, após 26 horas, 100% dos animais, controle positivo, apresentaram infecção, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 10,0±1,0 e 18,0±2,0 (i.p.). No grupo teste utilizando eluato de polpa *in natura*, nessas condições, 50,0% dos animais apresentaram a infecção, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 11,0±0,0 e 21,0±0,0 (i.p.) (Tabela 10).

Em relação aos grupos experimentais, para o tratamento térmico da mistura à temperatura ambiente por 24 horas, no controle positivo, 100% dos animais apresentaram infecção, com início da parasitemia e a morte, respectivamente, nos dias 4,0±0,0 e 15,0±0,0 (i.p.); 8,0±0,0 e 17,0±0,0 (gavagem) e 11,0±1,0 e 19,0±2,0 (oral). No grupo teste, os animais que receberam o eluato da tamisação apresentaram infecção com início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias 7,0±1,0 e 16,0±2,0 (90% pela i.p.); 11,0±2,0 e 17,0±2,0 (40% por gavagem) e 16,0±0,0 e 21,0±0,0 (20% pela via oral). Além disso, 20% dos animais que receberam a mistura total pela via oral também apresentaram infecção, com início da parasitemia e morte, respectivamente, em 14,0±3,0 e 21,0±4,0 (Tabela 12).

De acordo com Neves et al. (2007), o *T. cruzi* permaneceu infectante na polpa de açaí por até 12 horas a 5°C. Nossos resultados indicaram que o parasito manteve sua infectividade por até 24 horas, para o tratamento térmico da mistura a 4°C. No controle positivo, 100% dos animais apresentaram infecção, com início da parasitemia e a morte, respectivamente, nos dias 6,0±1,0 e 16,0±0,0 (i.p.); 11,0±0,0 e 21,0±0,0 (gavagem) e 12,0±2,0 e 22,0±3,0 (oral). No grupo teste, os

animais que receberam o eluato da tamisação apresentaram infecção com início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $10,0 \pm 3,0$ e $19,0 \pm 4,0$ (90% pela i.p.); $12,0 \pm 2,0$ e $21,0 \pm 4,0$ (60% por gavagem) e $14,0 \pm 1,0$ e $22,0 \pm 1,0$ (20% pela via oral). Além disso, 20% dos animais que receberam a mistura total pela via oral também apresentaram infecção, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $11,0 \pm 0,0$ e $21,0 \pm 0,0$ (Tabela 13).

Para o tratamento térmico da mistura a -20°C , no controle positivo, os animais apresentaram infecção, com início da parasitemia e a morte, respectivamente, nos dias $10,0 \pm 1,0$ e $20,0 \pm 1,0$ (100% pela i.p.); $14,0 \pm 0,0$ e $25,0 \pm 0,0$ (50% por gavagem) e $13,0 \pm 0,0$ e $25,0 \pm 0,0$ (50% pela via oral). No grupo teste, os animais que receberam o eluato da tamisação apresentaram infecção com início de parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $13,0 \pm 1,0$ e $24,0 \pm 1,0$ (20% pela i.p.); $13,0 \pm 0,0$ e $20,0 \pm 0,0$ (10% por gavagem) e $14,0 \pm 0,0$ e $22,0 \pm 0,0$ (10% pela via oral). Além disso, 10% dos animais que receberam a mistura total pela via oral também apresentaram infecção, com início da parasitemia e morte, respectivamente, nos dias $15,0 \pm 0,0$ e $22,0 \pm 0,0$ (Tabela 14).

Esses dados novamente contrastaram com os de Neves et al. (2007), que afirmaram que o *T. cruzi* era morto após o congelamento da polpa de açaí a -20°C durante 2 horas. Até então, dados a respeito da eficiência do congelamento para matar ou inativar o *T. cruzi* na polpa de açaí ainda eram controversos e este fato provavelmente se deve, entre outros fatores, à escolha do modelo animal e a cepa do parasito utilizada.

Embora não tenha ocorrido diferença significativa ($p=0,0101$) entre os tratamentos térmicos na preservação da virulência dos *T. cruzi* misturados à polpa de açaí *in natura* mantidos por 24 horas (Anexo 9.2), a antecipação do início da parasitemia observada nos grupos teste com a mistura mantida a 4°C ($14,0 \pm 1,0$ d.a.i. e $11,0 \pm 0,0$ d.a.i.), ambas utilizadas para infecções pela via oral, em relação ao controle positivo ($12,0 \pm 2,0$ d.a.i.) (Tabela 13) e respectivamente, ao grupo teste correspondente à temperatura ambiente ($16,0 \pm 0,0$ d.a.i. e $14,0 \pm 1,0$ d.a.i.) (Tabela 12), sugeriram que a polpa *in natura*, ao ser refrigerada, possivelmente exerceu função crioprotetora ao *T. cruzi*, considerando o período de incubação, o volume

da amostra, a quantidade de parasitos e a cepa como fatores que também desempenharam papéis importantes nessa função, bem como no aumento da virulência do *T. cruzi*.

Segundo Andrade (1976), há cepas que apresentam predominância de formas tripomastigotas sanguíneas delgadas, as quais apresentam tropismo diferenciado para células do sistema fagocitário mononuclear e parasitam com maior frequência esplenócitos, hepatócitos e células da medula óssea. Como característica, apresentam altos e precoces picos parasitêmicos. Apesar de serem mais sensíveis à ação dos anticorpos circulantes, determinam, na fase aguda, uma elevada taxa de mortalidade na maioria dos animais infectados.

Entretanto, existem cepas que apresentam como característica morfológica predominante a forma tripomastigota sanguínea larga e possuem um marcante tropismo para células musculares (musculatura lisa, esquelética e cardíaca) e para tecido glandular (RIBEIRO et al., 1982). Esse tipo de conformação morfológica confere ao referido tipo de cepa mais resistência aos anticorpos circulantes. Como consequência, estes permanecem por mais tempo na corrente circulatória, determinam picos parasitêmicos tardios e infecções de duração prolongada.

Houve diferença significativa ($p < 0,0001$) no início da parasitemia em relação às vias de administração testadas (Anexo 9.2), com retardo maior registrado na parasitemia da infecção oral, independentemente do tratamento térmico ou período de incubação da mistura contaminada.

A diferença significativa ($p < 0,0001$) observada nos inóculos foi responsável pelo grupo teste que recebeu a mistura total pela via oral em relação aos demais (Anexo 9.2). Os outros inóculos (controle positivo e grupo teste eluato) foram classificados dentro de um mesmo grupo, sem diferença significativa entre eles. Portanto, na realidade, essa diferença significativa se deve, mais uma vez, à via de administração, no caso, à via oral. Tal diferença não ocorreria se os inóculos fossem classificados apenas em controle positivo e grupo teste, sem distinção entre a administração do eluato ou da mistura total aos animais.

Embora o volume da amostra seja conhecido, a dose inoculada por animal é uma variável não controlada. Além disso, é importante considerar o período da

digestão e a maior distância percorrida pelo inóculo na via oral, desde a cavidade bucal até a penetração dos tripomastigotas, seja pela própria mucosa bucal, esofagiana, gástrica ou após vencer a barreira do suco gástrico, seja pelas porções iniciais do intestino delgado, que são as principais portas de entrada do parasito (STORINO & JÖRG, 1994).

Diaz-Ungría et al. (1968) verificaram que o êxito da via oral era geralmente dose-dependente, sendo eficiente com 10^5 formas do parasito e que o tempo para o início da parasitemia foi maior em relação à infecção produzida por injeção intramuscular, subcutânea ou intraperitoneal, quando cães se contaminaram pelo consumo de leite com fezes infectadas de *Rhodnius prolixus* e que o mesmo retardo ocorreu quando o leite foi substituído por soro fisiológico.

Neste estudo, os referidos autores provaram a penetração dos *T. cruzi* pelo intestino, por meio de cápsulas de gelatina, contendo fezes de triatomíneos infectados para liberação intestinal. Houve também a constatação da eficiência da mucosa do esôfago, mediante a infecção de tripomastigotas, com seringa especial, em cães.

Ao se comparar os resultados dos grupos experimentais ao dos experimentos preliminares, foi observado que os resultados relativos à porcentagem de infecção foram semelhantes após 24 horas da mistura contaminada e mantida a 4°C. Nos experimentos preliminares, 100% do controle positivo e do grupo teste (i.p.) apresentou infecção (Tabela 8). Nos grupos experimentais, houve 100% e 90% de infecção, respectivamente, no controle positivo e no grupo teste (i.p.) (Tabela 13).

Já após 24 horas de congelamento da mistura, os resultados para o controle positivo foram iguais, comparando os experimentos iniciais (Tabela 10) aos do grupo experimental (Tabela 14): 100% dos animais apresentaram infecção (i.p.). Para o grupo teste (i.p.), houve uma diferença de 50,0% entre o experimento inicial (Tabela 10) e o grupo experimental (Tabela 14). A diferença observada, neste caso, possivelmente ocorreu pelo fato de o volume da amostra ser maior no grupo experimental, correspondendo a um volume necessário para a infecção de

dez animais, o que pode ter contribuído para a não distribuição homogênea dos parasitos por toda a mistura.

Para os ensaios realizados sob condições de congelamento da mistura, os resultados possibilitaram a comparação da viabilidade dos parasitos mantidos sob estresse térmico, uma vez que a polpa de açaí congelada pode ser consumida de diversas maneiras pela população (OLIVEIRA et al., 2002). Porém, ensaios posteriores poderão indicar que a virulência do parasito se mantém preservada durante um período superior de congelamento da polpa nessas mesmas condições.

A administração do volume total dos inóculos em todos os experimentos, associada aos grupos que receberam o eluato pela via gavagem, certificou que a quantidade de parasitos, foi em sua totalidade administrada aos animais, independentemente de sua distribuição nas amostras ou da não ingestão da totalidade do inóculo via oral. Dessa forma, a existência de apenas um parasito ou de vários parasitos com virulência preservada foi capaz de causar a infecção experimental.

No caso da fase aguda da doença de Chagas pela infecção oral, dados obtidos da literatura demonstraram a existência de diferentes linhagens de *T. cruzi*, apropriadas à transmissão por essa via. Estudos experimentais em camundongos indicaram que os tripomastigotas foram capazes de invadir a mucosa gástrica e causar a infecção devido à presença de glicoproteínas de superfície, promotoras da penetração do parasito. Avaliações bioquímicas indicaram a presença de três grandes grupos de glicoproteínas: gp90, gp82 e gp30, cada uma delas com diferenças no nível de afinidade pela mucina e resistência ao suco gástrico (YOSHIDA, 2008).

De acordo com a autora, o sucesso da infecção pela via oral foi associado à expressão da gp82, uma glicoproteína de superfície específica, capaz de estabelecer ligação entre a mucina e as células epiteliais gástricas. A molécula promoveu a entrada dos tripomastigotas por meio de uma reação em cascata, com a mobilização de cálcio intracelular (YOSHIDA, 2008).

Linhagens de *T. cruzi* deficientes em gp82 puderam também, em alguns casos, invadir células *in vitro*. A condição identificada foi a estimulação da expressão de gp30, molécula que sinaliza o cálcio. Em contrapartida, estudos em camundongos demonstraram que parasitos que expressaram essa molécula de maneira prioritária, mostraram-se menos virulentos pela via oral em razão de a gp30 apresentar baixa afinidade pela mucina gástrica. Além disso, tripomastigotas também expressaram gp90, uma glicoproteína que faz ligação com as células do hospedeiro e atuou como molécula moduladora negativa da invasão (CORTEZ et al., 2006).

Linhagens que expressaram altos níveis da gp90, superiores à gp82 e gp30, tiveram baixo poder de infecção em células *in vitro*. Contudo, a eficiência da gp90 na infecção oral pode ser variada, em virtude de suas isoformas apresentarem diferentes graus de suscetibilidade à digestão péptica, em contraste à gp82 e gp30, resistentes à degradação pela pepsina presente no suco gástrico (YOSHIDA, 2008). Apesar do surto de transmissão oral a seres humanos pela ingestão do caldo de cana contaminado em Navegantes (SC), exames endoscópicos de pacientes agudos demonstraram lesões ulceradas na mucosa intestinal, evidenciando a presença, penetração e propagação dos *T. cruzi* e, portanto, a superação da barreira do suco gástrico (STEINDEL et al., 2005).

Dessa maneira, a diversidade genética das linhagens de *T. cruzi*, aliadas à habilidade de produção de glicoproteínas, foi capaz de responder, em parte, pela severidade dos casos notificados em surtos de infecção oral (YOSHIDA, 2008).

Os resultados indicaram que a mortalidade dos animais infectados, pelas diferentes vias de administração, ocorreu em um período de até 25 dias. Esses resultados foram experimentais e demonstraram a preservação da virulência do *T. cruzi* na DCA em hospedeiros imunodeficientes. O protocolo experimental foi abrangente para contemplar todas as possibilidades de consumo da polpa de açaí, ao simular condições extremas tanto do ponto de vista do parasito bem como do hospedeiro.

É importante ressaltar que a aproximação desses resultados experimentais à mortalidade ou à severidade nos surtos de transmissão alimentar em humanos,

na região Norte do país pela ingestão da polpa de açaí contaminada, deve considerar, entre outros fatores, os diferentes hábitos alimentares da população, o tempo de permanência de determinado alimento no estômago, os hábitos das famílias de fazer as refeições em horários diferentes, dentro ou fora de casa, a dificuldade da investigação do açaí proveniente de diversos fornecedores (VALENTE et al., 2005) e, ainda, o consumo da polpa *in natura*, a quantidade de parasitos ingeridos, o estado nutricional, a idade, o grau de estresse, o sistema imunológico e a constituição genética dos hospedeiros, considerando o caráter poligênico, multifatorial e o trato complexo da doença de Chagas (PASSOS, 2003).

Esta pesquisa atendeu a uma questão de saúde pública relativa à doença de Chagas aplicada e, para sua realização, foi indispensável o uso de modelos experimentais a fim de demonstrar que o *T. cruzi* foi capaz de sobreviver e preservar a sua virulência na polpa de açaí por diferentes períodos de incubação e sob diversos tratamentos térmicos.

Embora ainda existam eventos relacionados à DCA que necessitem ser esclarecidos *in vivo*, tais como a demonstração da hipótese central da contaminação da polpa de açaí por meio da trituração de triatomíneos infectados com a polpa, a cinética de inativação térmica do parasito, a análise da sobrevivência e preservação da virulência após prolongados períodos de congelamento da polpa, a análise da virulência do *T. cruzi* em linhagens de camundongos imunocompetentes, o estudo das lesões de fase aguda e crônica e a comparação dos ensaios com cepas nativas do parasito, até o momento presente, a essência nas análises de virulência do *T. cruzi* em diversos alimentos se restringiu a ensaios biológicos.

Dessa maneira, novas perspectivas para o estudo da transmissão oral da doença de Chagas devem ser apontadas (PANAFTOSA, 2009), como a avaliação do metabolismo respiratório do parasito *in vitro* após o contato com a polpa de açaí, a demonstração da metaciclologênese na própria polpa e, principalmente, a padronização de testes moleculares com propósitos diagnósticos para o desenvolvimento de uma metodologia de isolamento e detecção, em larga escala,

dos *T. cruzi* em produtos alimentícios (PANAFTOSA, 2006). No caso da polpa de açaí, esses testes permitirão a identificação de possíveis contaminações durante a cadeia produtiva e são de grande importância, uma vez que a transmissão oral agrava o caráter epidemiológico da doença, ao descartar os processos de refrigeração e congelamento como métodos de controle na transmissão oral da DCA e induz a uma nova reflexão, antes fortemente vinculada ao subdesenvolvimento.

Apesar dos esforços de grupos de pesquisa em países em desenvolvimento, dado o grande número de casos ocorridos entre 2006 e 2008 (NÓBREGA et al., 2009; SVS, 2010), é possível considerar não apenas tratar-se de uma contaminação acidental, mas ao contrário, poderá ser uma nova tendência para os próximos anos caso não seja controlada.

A principal proposta para controle da transmissão oral nas áreas endêmicas do *T. cruzi*, bem como de diversos outros patógenos em alimentos de uma maneira geral, ainda é a implantação de programas cuja prioridade seja a prevenção, por meio de mudanças de comportamento e condutas eficientes de higiene durante todas as etapas da cadeia produtiva, desde a manipulação da colheita da matéria-prima, até a comercialização dos alimentos, de modo que se garanta a segurança alimentar da população (PANAFTOSA, 2006;2009).

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pela análise da polpa de açaí contaminada com *T. cruzi*, concluiu-se que:

1. A metodologia de isolamento adotada para a análise da sobrevivência *in vitro* e da virulência *in vivo* das formas tripomastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* presentes na polpa de açaí foi a separação em lã de *nylon*, que mostrou eficiência por permitir a visualização e caracterização da motilidade dos parasitos, livre dos resíduos da polpa de açaí;
2. O *T. cruzi* sobreviveu e preservou sua virulência após ser mantido por até 48 horas à temperatura ambiente na mistura com a polpa de açaí autoclavada;
3. O *T. cruzi* sobreviveu e preservou sua virulência na mistura com a polpa de açaí *in natura* após ser mantido por até 24 horas à temperatura ambiente, por até 144 horas à temperatura de refrigeração (4°C) e por até 26 horas de congelamento (-20°C);
4. Em todas as vias de administração utilizadas e em todos os períodos de incubação e tratamentos térmicos observaram-se a sobrevivência e a preservação da virulência do *T. cruzi* na polpa de açaí;
5. Houve diferença significativa entre as vias de administração utilizadas, com retardo médio maior (5 dias) registrado na parasitemia da infecção oral, quando da análise da preservação da virulência dos *T. cruzi* mantidos durante 24 horas na mistura com a polpa de açaí *in natura*;
6. Os processos de refrigeração da polpa de açaí por até 144 horas e congelamento durante 26 horas não se mostraram efetivos como métodos de controle à transmissão alimentar da DCA;
7. Os resultados são inovadores e poderão contribuir com estratégias do Ministério da Saúde na prevenção de novas microepidemias de DCA por transmissão alimentar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA BRASIL. Município do Amazonas registra surto de doença de Chagas. **Notícias da Amazônia On Line**, Manaus, 11 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.noticiasdaamazonia.com.br/11165-municipio-do-amazonas-registra-surto-de-doenca-de-chagas/>>. Acesso em: 15 jan. 2010.

ALVES, D. P. ***Trypanosoma cruzi***: A influência dos linfócitos T na regulação da infecção experimental em camundongos SCID. 1998. 85 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1998.

AMATO-NETO, V.; SANTOS, R. R.; GIOIA, I. **Estudo experimental sobre o congelamento do plasma e implicações referentes à transmissão da doença de Chagas em serviços de hemoterapia**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, n. 9, p. 129-132, 1975.

AMATO-NETO, V.; LOPES, M. H.; UMEZAWA, E. S.; RUOCCO, R. M. S. A.; DIAS, J. C. P. **Outras formas de transmissão do *Trypanosoma cruzi***. Revista de Patologia Tropical, n. 29, p. 115-130, 2000.

ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. **Anatomo-pathological aspects and therapeutic response in experimental chronic Chagas disease**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 18, n. 4, p. 268-275, 1976.

AÑEZ, N.; CRISANTE, G. **Supervivencia de formas de cultivo de *Trypanosoma cruzi* en alimentos experimentalmente contaminados**. Boletín de Malariología y Salud Ambiental, n. XLVIII(1), p. 91-94, 2008.

ARAÚJO-JORGE, T. C. **Modelos animais para o estudo *in vivo* da doença de Chagas e de seus aspectos histopatológicos**. In: Doença de Chagas: Manual para experimentação. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 133-137, 2000.

ARAÚJO-JORGE, T. C.; PIRMEZ, C. **Normas de segurança para o trabalho com *Trypanosoma cruzi***. In: Doença de Chagas: Manual para experimentação. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 125-132, 2000.

BARBOSA, P. R. B. ***The oral transmission of Chagas' disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. International Journal of Cardiology***, n. 112, p. 132-133, 2006.

BELTRÃO, H. B. M.; CERRONI, M. P.; ROBERTO, D.; FREITAS, C.; PINTO, A. Y. N.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A. S.; COSTA, E. G.; SOBEL, J. ***Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Pará State, Brazil, in 2007. Tropical Doctor***, n. 39(4), p. 231-232, 2009.

BENCHIMOL-BARBOSA, P. R. ***Further comments on oral transmission of Chagas' disease in Brazil: Epidemiology, geographical distribution and viability of the infective parasite. International Journal of Cardiology***, 3 p., 2009.

BOSMA, G. C.; CUSTER, R. P.; BOSMA, M. J. ***A severe combined immunodeficiency mutant in the mouse. Nature***, v. 301, p. 527-530, 1983.

BOSMA, G. C.; DAVISON, M. T.; RUTTSCH, N. R.; SWEET, H. O.; SCHULTZ, L. D. ***The mouse severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16. Immunogenetics***, n. 29, p. 54-57, 1989.

BOVI, M. L. A. **Resultados de pesquisa referentes à exploração, manejo e cultivo do açaí**. In: Açaí - possibilidades e limites em processos de desenvolvimento sustentável no estuário amazônico, Belém: Editora Alves, p. 53-78, 2004.

BOWLING, A. T. ***Medical Genetics - Blood and immunologic defects. In: Horses Genetics, Wallingford: CAB International***, p.106-107, 1996.

BRENER, Z. **Therapeutic activity as criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi***. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 4, p. 389-396, 1962.

BRITTO, C. C. **Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: Value and limitations**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, n. 104(1), p. 122-135, 2009.

CABEZA-MECKERT, P; LAGUENS, R. **Modelos experimentales**. In: *Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires: Doyma, p. 129-140, 1994.

CALVO-MÉNDEZ, M. L.; NOGUEDA-TORRES, B.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; CORTÉS-JIMÉNEZ, M. **Infecção experimental con *Trypanosoma cruzi* a través de agua y alimentos contaminados**. Revista Latino-Americana de Microbiología, v. 36, n. 1, p. 67-69, 1994.

CAMANDAROBA, E. L.; PINHEIRO LIMA, C. M.; ANDRADE, S. G. **Oral transmission of Chagas' disease: Importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 44, n. 2, p. 97-103, 2002.

CASTANHO, R. E. P.; MARTINS, L. P. A.; GODOY, C. A. P.; ROSA, R. M. **Infecção experimental de camundongos através da ingestão de caldo de cana contaminado por *Trypanosoma cruzi***. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 35(1), p. 176, 2002.

CHAGAS, C. R. J. **Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, n. 1, p. 159-218, 1909.

CORTEZ, M.; SILVA, M. R.; NEIRA, I.; FERREIRA, D.; SASSO, G. R. S.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; YOSHIDA, N. ***Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice.** *Microbes and Infection*, v. 8(1), p. 36–44, 2006.

COURA, J. R. **Mecanismos de transmissão da infecção chagásica ao homem por via oral.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30(I), p. 45-47, 1997.

COURA, J. R. **Tripanosomose, doença de Chagas.** *Ciência e Cultura*, v. 55, n. 1, p. 30-33, 2003.

CUSTER, R. P.; BOSMA, G. C.; BOSMA, M. J. ***Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms.*** *American Journal of Pathology*, v. 120, p. 464-477, 1985.

DEANE, M. P.; LENZI, H. L.; JANSEN A. M. ***Trypanosoma cruzi: Vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum Didelphis marsupialis.*** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, n. 79(4), p. 513-515, 1984.

DIAS, E. **Transmissão do *Schizotrypanum cruzi* entre vertebrados por via digestiva.** *Brasil Médico*, n. 54, p. 775, 1940.

DIAS, J. C.; MACHADO, E. M.; FERNANDES, A. L.; VINHAES, M. C. ***General situation and perspectives of Chagas' disease in Northeastern Region, Brazil.*** *Cadernos de Saúde Pública*, v. 16, p. 13-34, 2000.

DIAS, J. C. P. **O desafio da doença de Chagas nos centros urbanos.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32 (II), p. 45-48, 1999.

DIAS, J. C. P. **Epidemiologia.** *In: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas.* 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 48-74, 2000.

DIAS, J. C. P. **Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39, n. 4, p. 370-375, 2006.

DIAS, J. P.; BASTOS, C.; ARAÚJO, E.; MASCARENHAS, A. V.; MARTINS NETTO, E.; GRASSI, F.; SILVA, M.; TATTO, E.; MENDONÇA, J.; ARAÚJO, R. F.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; ARAS, R. **Surto de doença de Chagas aguda associada à transmissão oral.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 41(3), p. 296-300, 2008.

DIAZ-UNGRÍA, C. **Estudio experimental del *Trypanosoma cruzi* en el perro y otros vertebrados. El problema de la transmisión.** *Kasmera (Venezuela)*, v. 3, p. 73-88, 1968.

DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas brasileiras.** 2. ed. Jaboticabal: Novos Talentos, 2004, 248 p.

DUALIBI, Julia. O açaí na trilha do kiwi. **Veja On Line**, São Paulo, 11 abr. 2007. Disponível em: <http://veja.abril.uol.com.br/110407/p_102.shtml>. Acesso em: 01 abr. 2008.

FERREIRA, C. S.; MARTINHO, P. C.; AMATO-NETO, V.; CRUZ, R. R. B. **Pasteurization of human milk to prevent transmission of Chagas disease.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 43, n. 3, p. 161-162, 2001.

FORATTINI, O. P.; SILVA, E. O. R.; BARATA, J. M. S.; BOAINAIN, E. **Nota sobre caso autóctone de tripanossomíase americana no litoral sul do Estado de São Paulo, Brasil.** Revista de Saúde Pública, v. 14, n. 1, p. 143-149, 1980.

FREITAS, G. D.; NÓBREGA, A. A.; ROMANO, A. P.; COSTA, E. G.; TINOCO, J. M.; PONTES, M. D.; LEITE, L. S.; SOBEL, J. **Novel food implicated in an outbreak of**

orally-transmitted acute Chagas disease in an urban area of the Amazon Region, Brazil, 2007. In: *INTERNATIONAL CONFERENCE ON EMERGING INFECTIOUS DISEASES (ICEID), 2008, Atlanta. Program and Abstracts Book*, p. 121, 2008.

GODARD, A. L. B.; GUÉNET, J. L. **Genética de camundongos:** Modelos animais de doenças humanas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 2, p. 96-100, 1999.

GORDON, B. E.; DURFEE, W. J.; BENNETT, M.; PAKES, S. P. **Differential white blood cell counts as a preliminary screen for severe combined immunodeficient congenic mice.** *Laboratory Animal Science*, n. 41(3), p. 255-257, 1991.

HERNANDÉZ, L. M.; CANO, A. N. R.; CUCUNUBÁ, Z.; ZAMBRANO, P. **Brote de Chagas agudo em Lebrija, Santander 2008.** *Revista Del Observatorio de Salud Pública de Santander (OSPS)*, n. 4(1), p. 28-36, 2009.

HOMMA, A. K. O.; NOGUEIRA, O. L.; MENEZES, A. J. E. A.; CARVALHO, J. E. U.; NICOLI, C. M. L.; MATOS, G. B. **Açaí:** Novos desafios e tendências. *Amazônia: Ciência & Desenvolvimento*, v. 1, n. 2, p. 7-23, 2006.

HOUAISS, A.; VILLAR, M. de S.; FRANCO, F. M. de M. **Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa.** Rio de Janeiro: Objetiva, 2001, 2922 p.

IANNI, B. M.; MADY, C. **Como era gostoso meu caldo de cana.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 85, n. 6, p. 379-381, 2005.

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS. **Diário do Pará,** Ananindeua, 25 ago. 2009. Disponível em: <<http://iah.iec.pa.gov.br/iah/fulltext/noticias/2009/25ago2009diariodopara.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2010.

ISID. INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES **ProMED-mail:** *Trypanosomiasis, foodborne - Venezuela: (Vargas), guava juice, 06 apr. 2009. File*

number 20090406.1328. Disponível em: <http://www.promedmail.org/pls/otn/f?p=2400:1202:3498272867640481::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,76922>. Acesso em: 25 ago. 2009.

JANSEN, A. M.; DEANE, M. P. ***Trypanosoma cruzi* infection of mice by ingestion of food contaminated with material of the anal gland of the opossum *Didelphis marsupialis***. In: REUNIÃO SOBRE PESQUISA BÁSICA EM DOENÇAS DE CHAGAS, 1985, Caxambu. Anais do evento, p. 39, 1985.

JURI, M. A.; FERREIRA, A.; RAMOS, A.; HOECKER, G. ***Non-lytic antibodies in H-2 controlled resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi****. *Brazilian Journal of Medical Biology*, v. 23, p. 685-695, 1990.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. **Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: Atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas**. *Ciência Rural*, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; NAIFF, R. D. ***Chagas disease in the Amazon basin: Speculations on transmission "per os"***. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, n. 22, p. 294-297, 1980.

LEWINSOHN, R. Do caldo de cana ao suco de açaí (Parte I). **Jornal da Unicamp**, Campinas, ano XIX, n. 283, p. 2, 11 abr. 2005a.

LEWINSOHN, R. Do caldo de cana ao suco de açaí (Parte II). **Jornal da Unicamp**, Campinas, ano XIX, n. 287, p. 2, 09 mai. 2005b.

LICHTENTHÄLER, R.; RODRIGUES, R. B.; MAIA, J. G. S.; PAPAGIANNPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. ***Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Martius (açaí) fruits***. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 56, n. 1, p. 53-64, 2005.

LOPES E. R.; CHAPADEIRO, E. **Pathogenesis of American Trypanosomiasis**. In: *The Trypanosomes*. London: CAB International, p. 303-330, 2004.

MANAUS. **Reunião Internacional sobre Vigilância e Prevenção da Doença de Chagas na Amazônia. Implementação da Iniciativa Intergovernamental de Vigilância e Prevenção da Doença de Chagas na Amazônia**. Relatório Técnico. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 38(1), p. 82-89, 2005.

MARCONDES, C. B.; GUEDES, L. A.; MENDONÇA, D. **Surto de doença de Chagas com provável contaminação oral em Catolé do Rocha (PB) - observações epidemiológicas**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 20(II), p. M11-M13, 1987.

MAYER, H. F. **Infecção experimental con Trypanosoma cruzi por via digestiva**. An. Inst. Med. Region (Corrientes), v. 5, p. 43-48, 1961.

MAZZA, S.; MONTANA, A.; BENITEZ, C.; JANZI, E. **Transmisión del Schizotripanum cruzi al niño por leche de madre con enfermedad de Chagas**. MEPRA, v. 28, p. 41-49, 1936.

McGUIRE, T. C.; POPPIE, M. J. **Hypogammaglobulinemia and thymic hypoplasia in horses: A primary combined immunodeficiency disorder**. Infection and Immunity, v. 8, p. 272-277, 1973.

MENEZES, E. M. S. **Efeito da alta pressão hidrostática em polpa de açaí pré-congelada (Euterpe oleracea Mart.)**. 2005. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

MERUSSE, J. L. B; LAPICHIK, V. B. V. **Instalações e equipamentos**. In: Manual para técnicos em bioterismo. 2. ed. São Paulo: EPM, 1996, 259p.

MEZADRI, T. J.; TOMAZ, V. A.; AMARAL, V. L. L. **Animais de Laboratório. Cuidados na iniciação experimental.** Florianópolis: UFSC, 2004, 154 p.

MILES, M. A. ***Orally Acquired Chagas Disease: Lessons from an Urban School Outbreak.*** *The Journal of Infectious Diseases*, v. 201, p. 1282-1284, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Chagas:** Descrição da doença. Brasília. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?=31114>. Acesso em: 17 jun. 2009.

MONCAYO, A. ***Chagas' disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries.*** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. ***Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy.*** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104(I), p. 17-30, 2009.

MONTEIRO, S. **Açaí:** Da fruta exótica à vedete de consumo. Frutas e Derivados, v. 1, n. 2, p. 29-32, 2006.

NEIDA, S.; ELBA, S. ***Caracterización del açaí o manaca (Euterpe oleracea Martius): Un fruto del Amazonas.*** *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 57, n. 1, p. 94-98, 2007.

NEVES, A. L. L.; GOMES, F. S.; FREITAS, A. M.; ALMEIDA, R. N.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A. S. **Estudo experimental da viabilidade do *Trypanossoma cruzi* no açaí e infecção em camundongos.** In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA (SBPC), 59^a., 2007, Belém. Anais eletrônicos. Disponível em: <<http://www.servicos.sbpcnet.org.br/sbpc/59ra/senior/livroeletronico/resumos/R7591-1.html>>. Acesso em: 09 Jun. 2008.

NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W. N. **Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil.** *Emerging Infectious Diseases*, v.15(4), p. 653-655, 2009.

NOGUEIRA, O. L.; CARVALHO, C. J. R.; MULLER, C. H.; GALVÃO, E. U. P.; SILVA, H. M. E.; RODRIGUES, J. E. L. F.; OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J. E. U.; ROCHA NETO, O. G.; NASCIMENTO, W. M. O.; CALZAVARA, B. B. G. **A cultura do açai.** Brasília: EMBRAPA, 49p., 1995.

NOYA, B. A.; DÍAZ-BELLO, Z.; COLMENARES, C.; RUIZ-GUEVARA, R.; MAURIELLO, L.; ZAVALA-JASPE, R.; SUÁREZ, J. A.; ABATE, T.; NARANJO, L.; PAIVA, M.; RIVAS, L.; CASTRO, J.; MÁRQUES, J.; MENDOZA, I.; ACQUATELLA, H.; TORRES, J.; NOYA, O. **Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas' disease at a school in Caracas, Venezuela.** *The Journal of Infectious Diseases*, v. 201, p. 1308-1315, 2010.

OLIVEIRA, M. S. P.; MÜLLER, A. A. **Caracterização e avaliação de germoplasma de açai (*Euterpe oleracea* Mart.).** Belém: EMBRAPA-CPATU, 3p., 1998.

OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O.; MÜLLER, C. H. **Cultivo do açazeiro para produção de fruto.** Circular Técnica 26. Belém: EMBRAPA, 17p., 2002.

OLIVEIRA, S. B. C.; NOGUEIRA, O. L.; ALMEIDA, D. M.; ALBUQUERQUE, P. L. M. M.; MONT'ALVERNE, T. N. S. **Doença de Chagas aguda por transmissão via oral.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICA MÉDICA, 9º., 2007, Curitiba. Anais do evento, 2007. CD-ROM.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; HAWKEN, P.; TALCOTT, S. T. **Phytochemical, antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Martius) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage.** *Food Research International*, v. 40, n. 5, p. 620-628, 2007.

PANAFTOSA. **Consulta técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39, n. 5, p. 512-514, 2006.

PANAFTOSA. **Doença de Chagas: Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos.** Rio de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS, Série Manuais Técnicos, 12, 92p., 2009.

PASSOS, L. A. C.; ALVES, D. P. **Isoladores.** In: Manual para técnicos em bioterismo. 2. ed. São Paulo: EPM, p. 27-34, 1996.

PASSOS, L. A. C.; SAKURADA, J. K.; GUARALDO, A. M. A.; ORTIZ, S. C. B. C.; RANGEL, H. A.; GUÉNET, J. L. **CHAGAS:** Fenômeno da Resistência. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, v. 5, p. 26-31, 2002.

PASSOS, L. A. C. **Análise do determinismo genético da resistência de camundongos infectados experimentalmente com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** 2003. 137 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003.

PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; GUARALDO, A. M. A.; FRANCO, R. M. B.; DIAS, V. L.; PASSOS, L. A. C. **Chagas' disease as a foodborne illness.** *Journal of Food Protection*, v. 72(2), p. 441-446, 2009.

PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; BARBOSA-LABELLO, R.; GUARALDO, A. M. A.; FRANCO, R. M. B.; DIAS, V. L.; PASSOS, L. A. C. **Transmission of Chagas' disease (American trypanosomiasis) by foods.** *Foods and American trypanosomiasis.* California: *Advances in Food and Nutrition Research*, v. 59, p. 63-85, 2010.

PINTO, A. Y. N.; VALENTE, S. A. S.; LOPES, R.; SILVA, O.; CASTRO, T. B.; VALENTE, V. C. **Ocorrência de tripanossomíase aguda familiar no município de**

Igarapé-Miri, Pará: Gravidade de apresentação clínica em idosos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 36(1), p. 381, 2003.

PINTO, P. L. S.; AMATO-NETO V.; NASCIMENTO, S. A. B.; SOUZA, H. B. W. T.; MYAMOTO, A.; MOREIRA, A. A. B.; BRAZ LIMA, A. **Observações sobre a viabilidade do *Trypanosoma cruzi* no caldo de cana.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 32, p. 325-327, 1990.

PIZZI, T; AGOSÍN, M.; CHRISTEN, R.; HOECKER, G; NEGhme, A. ***Influencia de la constitución genética en la resistencia de la laucha a la infección experimental por Trypanosoma cruzi.*** *Biologica*, v.8, p. 43-53, 1948.

PORTES, L. **Agroindústria:** Pela qualidade das polpas. Frutas e Derivados, n. 9, p. 26-29, 2008.

POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T. **Açaí (*Euterpe oleracea Martius*): Polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, n. 4, p. 1222-1229, 2006.

REED, S. M.; BAYEY, W. M. ***Disorders of the immune system.*** In: *Equine internal medicine*. 1. ed. Saunders Company, p. 47-53, 1998.

RIBEIRO, R. D.; FERRIOLI FILHO, F.; BELDA NETO, F. M. **Comportamento de subamostras do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiro vertebrado e invertebrado.** Revista Brasileira de Biologia, v. 42, p. 51-54, 1982.

RIBEIRO, R. D.; RISSATO E GARCIA, T. A.; BONOMO, W. C. **Contribuição para o estudo dos mecanismos de transmissão do agente etiológico da doença de Chagas.** Revista de Saúde Pública, v. 21, n. 1, p. 51-54, 1987.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J. **Chagas disease: An emerging food-borne entity?** *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 2, p. 149-150, 2008.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; SILVESTRE, J.; CARZOLA-PERFETTI, D. J. **Chagas disease in Barcelona, Spain.** *Acta Tropica*, v. 112, p. 86-87, 2009.

ROELLIG, D. M.; ELLIS, A. E.; YABSLEY, M. J. **Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* with opposing evidence for the theory of carnivory.** *Journal of Parasitology*, v. 95(2), p. 360-364, 2009.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação.** Belém: UFPA, 2000, 315p.

SANTOS, B. F. **Macro e micro ambientes.** *In: Animais de laboratório: Criação e experimentação.* Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002, 388p.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D. ; KABABICK, J. P. **Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (açaí).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 22, p. 8598-8603, 2006a.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; AGARWAL, A.; JENSEN, G. S.; HART, A. N.; SHANBROM, E. **Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (açaí).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 22, p. 8604-8610, 2006b.

SESA. SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ. Surto de doença de Chagas em Redenção. **Nota Técnica**, 14 mar. 2006, 2p., 2006.

SHAW, J.; LAINSON, R.; FRAIHA, H. **Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil.** Revista de Saúde Pública, v. 3, n. 2, p. 153-157, 1969.

SHIKANAY-YASUDA, M. P. **Surto epidêmico de doença de Chagas aguda em Catolé do Rocha, Paraíba.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 20(II), p. M14-M15, 1987.

SHIKANAY-YASUDA, M. P.; MARCONDES, C. B.; GUEDES, L. A.; SIQUEIRA, G. S.; BARONE, A. A.; DIAS, J. C. P.; AMATO-NETO, V.; TOLEZANO, J. E.; PERES, B. A.; ARRUDA-JÚNIOR, E. R.; LOPES, M. H.; SHIROMA, M.; CHAPADEIRO, E. **Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 33, p. 351-357, 1991.

SILVA, N. N.; CLAUSELL, D. T.; NÚBILOS, H.; MELLO, A. L.; OSSANAI, J.; RAPONE, T.; SNELL, T. **Surto epidêmico da doença de Chagas com provável contaminação oral.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 10, n. 5, p. 265-276, 1968.

SIQUEIRA, G. C. L.; MENEZES, M.; SIQUEIRA, S. L.; SILVA, J. S. da; ALVAREZ-RIVERA, G. R.; VICENTE, C. A. R.; NIETO, M. D. **Açaí: Produtos potenciais da amazônia.** Brasília: MMA/SUFRAMA/SEBRAE/GTA, v. 19, 1998, 51p.

SOARES, V. A.; MARSDEN, P. D. **Persistência de infectividade do *Trypanosoma cruzi* em barbeiros mortos.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 20(4), p. 241, 1978.

SOARES, V. A., MARSDEN, P. D.; JOHNSON, C. **Efeito da dessecação das fezes de triatomíneos na sobrevivência de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 19(4), p. 233-238, 1986.

SOARES, V. A.; DIAS, J. C. P.; MARSDEN, P. D. **Sobrevivência do *Trypanosoma cruzi* em caldo de cana:** Resultados preliminares. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 20(2), p. 38, 1987.

SOMBERG, R. L.; PULLEN, R. P.; CASAL, M. L. **A single nucleotide insertion in the canine interleukin-2 receptor gamma chain results in X-linked severe combined immunodeficiency disease.** Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 47, p. 203-213, 1995.

SOUSA, C. L.; MELO, G. M. C.; ALMEIDA, S. C. S. **Avaliação da qualidade do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) comercializado na cidade de Macapá - AP.** Boletim CEPPA Curitiba, v.17, n. 2, p.127-136, 1999.

SOUSA, M. A. C.; YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; PANTOJA, L. **Suco de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.): Microbiological evaluation thermal treatment and shelf life.** Acta Amazônica, v. 36, n. 4, p. 497-502, 2006.

STEINDEL, M.; DIAS, J. C. P.; ROMANHA, A. J. **Doença de Chagas:** Mal que ainda preocupa. Ciência Hoje, v. 37, p. 32-38, 2005.

STORINO, R.; JÖRG, M. E. **Vias de infección y aspectos clínicos.** In: *Enfermedad de Chagas.* Buenos Aires: Doyma Argentina, p. 132-141, 1994.

SVS. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO BRASIL. Doença de Chagas aguda no município de Santana - Amapá. **Nota Técnica SVS 2005**, 04 abr. 2005. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21310>. Acesso em: 12 dez. 2007.

SVS. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO BRASIL. Doença de Chagas aguda por transmissão oral. **Nota Técnica SVS 2007b**, 23 ago. 2007. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas2308.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2007.

SVS. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO BRASIL. Doença de Chagas aguda por transmissão oral. **Nota Técnica SVS 2007c**, 26 set. 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas2609.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2007.

SVS. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO BRASIL. Doença de Chagas aguda. **Nota Técnica SVS 2007a**, 09 out. 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas_091007.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2007.

SVS. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO BRASIL. Casos de doença de Chagas aguda (DCA). Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2005 a 2008. **Nota Técnica SVS 2010**, 22 jan. 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_chagas.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2010.

SZAJNMAN, S. H.; RAVASCHINO, E. L.; DOCAMPO, R.; RODRIGUEZ, J. B. ***Synthesis and biological evaluation of 1-amino-1,1-bisphosphonates derived from fatty acids against Trypanosoma cruzi targeting farnesyl pyrophosphate synthase.*** *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v.15, n. 21, p. 4685-4690, 2005.

TATENO, M. C. N. **Exportação do açaí sob forma de bebida natural energética:** Apontando o mercado Alemão. 2001. 32 f. Monografia (Curso de Habilitação em Comércio Exterior) - Centro de Ensino Superior do Pará, Belém, 2001.

VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; FRAIHA NETO, H. ***Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the brazilian amazon.*** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94(1), p. 395-398, 1999.

VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; PINTO, A. Y. N. **Por que ocorrem episódios familiares de doença de Chagas associado à transmissão oral na amazônia brasileira?** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, n. 35(1), p. 165, 2002.

VALENTE, V. C.; ALMEIDA, A. J. B.; VALENTE, S. A. S.; PINTO, A. Y. N.; MIRANDA, C.; OLIVEIRA, R. A.; GOMES, F. S.; FREITAS, A. B.; BARBOSA, C. C. S.; SILVA, L. O. S.; FONSECA, J. M. C. **Nova microepidemia familiar com três casos de doença de Chagas em Belém, estado do Pará.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 38(1), p. 413, 2005.

VILLALOBOS, R. **Reaparición de Enfermedades Tropicales.** *Kasmera*, v. 35(2), p. 89-90, 2007.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global defense against the infectious disease threat.** Geneve: Mary Kay Kindhauser, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/infectious-disease-news/cds2002/chapter5.pdf>>. Acesso em: 17 set 2007.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas: One hundred years later.** *World Health Organ*, v. 87(7), p. 491-492, 2009.

YAEGER, R. G. **Transmission of Trypanosoma cruzi Infection to opossums via the oral route.** *The Journal of Parasitology*, v. 57(6), p. 1375-1376, 1971.

YOSHIDA, N. **Molecular mechanisms of Trypanosoma cruzi infection by oral route.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104(1), p. 101-107, 2008.

9. ANEXO

9.1. Evolução da parasitemia

Tabela 15. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via intraperitoneal com eluato da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, respectivamente na proporção 1:3, mantida por 24 horas à temperatura ambiente (Grupo Experimental A).

Animal	Parasitemia Grupo Experimental A									
	Número de parasitos/ 5 μ L de sangue, em d.a.i.*									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CP M ⁽¹⁾	1	15	36	76	123	NO**	NO	NO	NO	
CP F ⁽²⁾	2	18	60	102	177	NO	NO	NO	NO	
GTE M ⁽³⁾	0	0	0	1	4	22	49	72	NO	
GTE M	0	0	0	4	12	20	25	37	NO	
GTE M	0	0	1	3	9	25	59	NO	NO	
GTE M	0	0	0	0	2	5	11	27	45	
GTE M	0	0	0	0	1	2	4	10	55	
GTE F ⁽⁴⁾	0	0	3	18	45	59	68	NO	NO	
GTE F	0	0	1	7	29	48	87	NO	NO	
GTE F	0	0	2	12	33	67	97	NO	NO	
GTE F	0	0	0	1	9	31	69	80	NO	

⁽¹⁾ Controle Positivo Macho; ⁽²⁾ Controle Positivo Fêmea; ⁽³⁾ Grupo Teste Eluato Macho;

⁽⁴⁾ Grupo Teste Eluato Fêmea; * d.a.i.: dia após infecção; ** NO: Não Observado.

Tabela 16. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via gavagem com eluato da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, respectivamente na proporção 1:3, mantida por 24 horas à temperatura ambiente (Grupo Experimental B).

Animal	Parasitemia Grupo Experimental B										
	Número de parasitos/ 5 μ L de sangue, em d.a.i.										
	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
CP M	1	4	14	36	70	NO	NO	NO	NO	NO	
CP F	1	3	9	15	93	NO	NO	NO	NO	NO	
GTE M	0	2	7	29	47	66	NO	NO	NO	NO	
GTE M	0	0	0	1	22	46	93	145	NO	NO	
GTE F	0	0	0	3	77	150	162	208	NO	NO	
GTE F	0	0	0	0	0	4	56	110	117	136	

Tabela 17. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via oral com eluato ou mistura total da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, respectivamente na proporção 1:3, mantida por 24 horas à temperatura ambiente (Grupo Experimental C).

Parasitemia Grupo Experimental C												
Animal	Número de parasitos/ 5 μ L de sangue, em d.a.i.											
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
CP M	2	5	11	32	62	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
CP F	0	1	6	25	67	128	NO	NO	NO	NO	NO	NO
GTE M	0	0	0	0	0	0	3	29	78	103	175	NO
GTE F	0	0	0	0	0	0	2	17	85	147	259	NO
GTM M ⁽⁵⁾	0	4	15	44	52	118	NO	NO	NO	NO	NO	NO
GTM F ⁽⁶⁾	0	0	0	0	0	0	0	3	18	40	65	112

⁽⁵⁾ Grupo teste Mistura Macho; ⁽⁶⁾ Grupo Teste Mistura Fêmea.

Tabela 18. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via intraperitoneal com eluato da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, respectivamente na proporção 1:3, mantida por 24 horas a 4°C (Grupo Experimental D).

Parasitemia Grupo Experimental D												
Animal	Número de parasitos/ 5 μ L de sangue, em d.a.i.											
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
CP M	0	0	1	36	49	65	96	NO	NO	NO	NO	NO
CP F	1	2	3	65	134	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
GTE M	0	0	0	0	0	0	3	16	62	209	224	NO
GTE M	0	0	0	0	0	0	2	3	7	12	50	NO
GTE M	0	0	0	0	0	0	0	1	3	8	28	120
GTE M	0	0	0	0	0	1	4	10	27	131	NO	NO
GTE M	0	0	0	0	0	0	1	4	5	22	44	NO
GTE F	0	0	0	0	3	8	15	82	148	NO	NO	NO
GTE F	0	0	0	0	1	3	4	28	102	NO	NO	NO
GTE F	0	0	2	35	55	86	102	NO	NO	NO	NO	NO
GTE F	0	0	0	0	0	4	15	100	156	190	NO	NO

Tabela 19. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via gavagem com eluato da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, respectivamente na proporção 1:3, mantida por 24 horas a 4°C (Grupo Experimental E).

Parasitemia Grupo Experimental E								
Animal	Número de parasitos/ 5 μ L de sangue, em d.a.i.							
	10	11	12	13	14	15	16	17
CP M	0	1	3	12	25	40	NO	NO
CP F	0	2	6	50	54	183	NO	NO
GTE M	0	0	3	39	42	131	152	NO
GTE M	0	0	0	2	10	25	63	115
GTE F	3	25	50	106	186	NO	NO	NO
GTE F	0	0	2	16	20	199	228	NO
GTE F	0	0	2	20	45	104	186	NO
GTE F	3	38	70	156	196	NO	NO	NO

Tabela 20. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via oral com eluato ou mistura total da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, respectivamente na proporção 1:3, mantida por 24 horas a 4°C (Grupo Experimental F).

Parasitemia Grupo Experimental F										
Animal	Número de parasitos/ 5 μ L de sangue, em d.a.i.									
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
CP M	0	0	0	0	1	3	6	23	37	NO
CP F	1	2	12	26	55	NO	NO	NO	NO	NO
GTE M	0	0	0	0	0	1	7	16	24	46
GTE F	0	0	0	0	3	44	86	113	271	NO
GTM M	0	1	14	58	89	134	NO	NO	NO	NO
GTM F	0	2	15	48	96	147	NO	NO	NO	NO

Tabela 21. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via intraperitoneal com eluato da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, respectivamente na proporção 1:3, mantida por 24 horas a -20°C (Grupo Experimental G).

Parasitemia Grupo Experimental G								
Animal	Número de parasitos/ 5 μL de sangue, em d.a.i.							
	10	11	12	13	14	15	16	17
CP M	2	4	16	38	50	NO	NO	NO
CP F	0	1	5	7	47	92	NO	NO
GTE F	0	0	0	1	3	9	21	35
GTE F	0	0	2	3	4	46	75	NO

Tabela 22. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via gavagem com eluato da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, respectivamente na proporção 1:3, mantida por 24 horas a -20°C (Grupo Experimental H).

Parasitemia Grupo Experimental H						
Animal	Número de parasitos/ 5 μL de sangue, em d.a.i.					
	13	14	15	16	17	18
CP F	0	1	3	7	15	48
GTE M	2	27	49	74	99	NO

Tabela 23. Evolução da parasitemia em camundongos *scid* infectados pela via oral com eluato ou mistura total da polpa de açaí *in natura* e contaminada com 10^5 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, respectivamente na proporção 1:3, mantida por 24 horas a -20°C (Grupo Experimental I).

Parasitemia Grupo Experimental I							
Animal	Número de parasitos/ 5 μL de sangue, em d.a.i.						
	13	14	15	16	17	18	19
CP M	1	3	5	11	25	NO	NO
GTE M	0	1	7	19	34	51	NO
GTM F	0	0	1	3	7	22	63

9.2. Datos estadísticos

The SAS System

14:20 Wednesday, December 9, 2009

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values	
Treat	3	-20 4 RT	
Inoculum	3	PC TGE TGM	
Way	3	Gav Or ip	
Sex	2	F M	
Number of Observations Read			57
Number of Observations Used			57

The SAS System

14:20 Wednesday, December 9, 2009

The GLM Procedure

Dependent Variable: Detec

	Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value
Model	17	462.7800825	27.2223578	16.35
Error	39	64.9392157	1.6651081	
Corrected Total	56	527.7192982		
Source		Pr > F		
Model		<.0001		
Error				
Corrected Total				
R-Square	Coeff Var	Root MSE	Detec Mean	
0.876944	12.40342	1.290391	10.40351	

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
Treat	2	17.2655169	8.6327584	5.18
Inoculum	2	43.0676350	21.5338175	12.93
Way	2	150.7415606	75.3707803	45.26
Sex	1	0.0094156	0.0094156	0.01
Treat*Inoculum	4	17.4438904	4.3609726	2.62
Treat*Way	4	24.9994258	6.2498564	3.75

Source	Pr > F
Treat	0.0101
Inoculum	<.0001
Way	<.0001
Sex	0.9404
Treat*Inoculum	0.0496
Treat*Way	0.0112

The SAS System

14:20 Wednesday, December 9, 2009

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for Detec

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	39
Error Mean Square	1.665108
Harmonic Mean of Cell Sizes	10.33493

NOTE: Cell sizes are not equal.

Number of Means	2	3
Critical Range	1.148	1.207

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	Inoculum
A	13.0000	5	TGM
B	10.4722	36	TGE
B	9.4375	16	PC

The SAS System

14:20 Wednesday, December 9, 2009

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for Detec

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05	
Error Degrees of Freedom	39	
Error Mean Square	1.665108	
Harmonic Mean of Cell Sizes	17.89675	
NOTE: Cell sizes are not equal.		
Number of Means	2	3
Critical Range	.8725	.9174

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	Way
A	13.2000	15	Or
B	11.1250	16	Gav
C	8.3462	26	ip

9.3. Certificação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA/UNICAMP)



Figura 22. Certificado de aprovação do protocolo nº 1569-1 no comitê de ética na experimentação animal (CEEA/UNICAMP).

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada "Transmissão oral do *Trypanosoma cruzi* pela polpa de açai em camundongos"

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/UNICAMP, sob Protocolo(s) nº 1589-1.

* Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Rodrigo Labello Barbosa

Aluno: Rodrigo Labello Barbosa

Ana Maria Aparecida Guaraldo
Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Nome:

STEPHEN HYSLOP

Função:

Vice-Presidente CEEA